

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### La régulation des récepteurs des interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les kératinocytes épidermiques

Bourtembourg, Maureen

*Award date:*  
2016

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**UNIVERSITE DE NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**LA REGULATION DES RECEPTEURS DES INTERLEUKINES 4 ET 13 PAR LES  
MICRODOMAINES LIPIDIQUES DANS LES KERATINOCYTES EPIDERMiques**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Maureen BOURTEMBOURG

Janvier 2016

## **La régulation des récepteurs des interleukines 4 et 13 par les microdomaines lipidiques dans les kératinocytes épidermiques**

BOURTEMBOURG Maureen

### Résumé

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire chronique de la peau définie par des dysfonctions de la barrière épidermique et du système immunitaire. Il s'agit d'une pathologie principalement médiée par la réponse Th2 avec des niveaux élevés d'interleukines (IL)-4 et -13 retrouvés notamment dans l'épiderme. Ces cytokines peuvent lier un récepteur commun IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 afin d'activer la transduction du signal cellulaire, principalement via la voie JAK-STAT6 et également par d'autres voies telles que celle des MAPK. Une autre chaîne de récepteur, IL-13R $\alpha$ 2 dont la fonction est peu caractérisée, peut lier spécifiquement IL-13. Par ailleurs, le profil transcriptionnel des kératinocytes issus de peau lésionnelle de DA est similaire à celui des kératinocytes déplétés du cholestérol, suggérant que la signalisation dépendante des microdomaines lipidiques pourrait être perturbée dans les kératinocytes issus de lésions atopiques. À partir de ces observations, un modèle in vitro de DA a été mis au point en combinant une activation des kératinocytes par la déplétion du cholestérol, un des composant majeur des microdomaines lipidiques, à la stimulation aux interleukines associées à la réponse Th2 (IL-4, IL-13, IL-25). Cette combinaison induit des effets synergiques sur l'altération de la barrière d'un épiderme humain reconstruit (RHE) ainsi que des changements transcriptionnels de gènes des kératinocytes, comme trouvés dans la DA. Pour mieux comprendre ce phénomène, les chaînes IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 ont été investiguées dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques et/ou stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 dans des cultures de kératinocytes en monocouches ainsi que des RHE. L'ensemble de nos résultats suggère que l'effet synergique de la déplétion du cholestérol combinée à la stimulation aux interleukines ne résulterait ni d'une activation du récepteur IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 indépendante du ligand, ni d'une expression accrue de ses chaînes suite à la déplétion du cholestérol. Par contre, IL-4R $\alpha$  semble interagir avec son microenvironnement lipidique mais sa localisation au sein des microdomaines lipidiques reste à confirmer. La surexpression de IL-13R $\alpha$ 2, particulièrement observée lors de la combinaison des traitements, pourrait moduler les réponses aux IL-4 et -13. Des voies de signalisation différentes, selon la nature du stress cellulaire induit, seraient impliquées dans l'effet synergique. Les IL-4 et -13 perturberaient principalement l'homéostasie épidermique d'une manière STAT6-dépendante alors que la déplétion du cholestérol contribuerait, par l'activation des MAPK, à l'exacerbation du phénotype de DA observé en RHE lors de la combinaison des traitements.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

**Promoteur:** Y. Poumay

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier vivement mon promoteur, Mr Y. Poumay, qui m'a accueillie dans son laboratoire. Ses conseils avisés et précieux ont contribué à guider mes réflexions. Le temps qu'il m'a accordé lors de la réalisation de ce mémoire a été des plus salutaires. Merci pour sa disponibilité et l'intérêt qu'il a porté sur mon travail de recherche.

Je tiens à remercier particulièrement mes deux encadrants d'exception, Evelyne De Vuyst et Abdallah Mound, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Leur investissement personnel, leurs encouragements et la confiance qu'ils m'ont accordée furent pour moi très importants. Leur expertise respective en barrière épidermique et en microdomaines lipidiques fut d'une aide précieuse pour la concrétisation de ce mémoire. Enfin, merci pour la patience dont ils ont fait preuve pour répondre aux nombreuses questions qui me tarabustaient.

Je remercie tous les membres du LabCeTi et LNR qui, par leur accueil et leur convivialité m'ont permis de travailler dans une atmosphère agréable. Chacun d'entre eux a contribué à sa manière à l'élaboration de ce travail. Mes remerciements s'adressent en particulier à Catherine, pour la relecture de ce mémoire et pour ses conseils efficaces, à Valérie, Kathleen ainsi que Benoit, toujours prêts à rendre service. Merci pour l'apprentissage des techniques expérimentales, leur aide et leur bonne humeur. Merci à Daniel pour avoir partagé ses connaissances techniques en histologie ainsi qu'aux doctorants Jérémy, Aurélie, Joanna, Céline et Emilie pour les instants agréables passés en leur compagnie. Kathleen et Emilie, je suis contente d'avoir rejoint votre bureau où j'y ai pris plaisir à papoter et à partager des histoires.

Merci à Nicolas, Michael et Gwendoline, pour les bons moments passés en leur compagnie, pour leur soutien, leur présence mais surtout les blagues dont ils ont le secret et dont Benoit a été l'un des instigateurs.

Merci à Méryl et Vesela qui ont passé quelques mois au sein de l'équipe du LabCeTi avec qui j'ai pris plaisir à discuter.

Je remercie les membres de mon jury, Michel Jadot, Arnaud Machelart, Valérie Pireaux et Marie Toutfaire pour avoir accepté de lire ce mémoire.

Il me tient également à cœur de remercier mes amis et ma famille. Merci à mes parents et à mon frère de m'avoir toujours soutenue et encouragée durant mes années d'études. Merci pour le dévouement dont vous avez fait preuve.

# **TABLE DES MATIERES**

## **INTRODUCTION**

1	Physiologie de la peau .....	1
1.1	Structure générale de la peau .....	1
1.1.1	L'hypoderme .....	1
1.1.2	Le derme .....	1
1.1.3	L'épiderme .....	2
1.2	La différenciation épidermique .....	4
1.2.1	Les différentes couches de l'épiderme .....	4
1.2.2	Gradient de pH .....	5
1.2.3	Calcium .....	6
1.2.4	Les jonctions intercellulaires .....	6
1.3	Les fonctions de la peau .....	6
2	La dermatite atopique (DA).....	7
2.1	Définition générale .....	7
2.2	Histologie de la dermatite atopique .....	7
2.3	Facteurs intervenant dans la dermatite atopique.....	8
2.3.1	Facteurs génétiques .....	8
2.3.2	Facteurs environnementaux.....	10
2.4	Pathophysiologie .....	10
2.4.1	Mécanisme pathogénique .....	10
2.4.2	Mécanisme cellulaire.....	11
3	IL-4 et IL-13.....	12
3.1	Récepteurs et voies de signalisation .....	12
3.1.1	Récepteurs : IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2.....	12
3.1.2	Structure des chaînes IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$ 1.....	14
3.1.3	Voies de signalisation intracellulaires .....	15
3.2	Influence des IL-4, IL-13 sur l'épiderme et dans la DA .....	16
4	Les microdomaines lipidiques et transduction du signal.....	16
4.1	Composition et organisation dynamique de la membrane plasmique .....	16
4.2	Les microdomaines lipidiques.....	17
4.3	L'importance du cholestérol dans la signalisation des kératinocytes .....	18
5	Objectif du mémoire.....	20

## **MATÉRIEL & MÉTHODES**

1	Culture cellulaire .....	22
1.1	Culture primaire .....	22
1.2	Culture secondaire .....	22
1.3	Cryopréservation des kératinocytes.....	23
1.4	Culture tertiaire.....	23
2	Différents stress cellulaires et traitements des kératinocytes .....	24
2.1	Déplétion du cholestérol membranaire.....	24
2.2	Stimulation aux interleukines .....	25
2.3	Traitement avec des inhibiteurs ou anticorps neutralisants .....	25
3	Test de viabilité cellulaire (test MTT).....	25
4	Étude de la localisation des récepteurs au sein de l'épiderme.....	26
4.1	Inclusion en paraffine .....	26
4.2	Coupes à congélation.....	26
4.3	Coloration Hémalum Erythrosine Safran (HES) .....	26
4.4	Marquage immunofluorescent sur tissus .....	27
5	Étude de la localisation des récepteurs au sein de la cellule et des microdomaines lipidiques .....	27
5.1	Marquage immunofluorescent sur lamelles.....	27
5.2	Marquage des microdomaines lipidiques avec des sondes fluorescentes.....	28
6	Analyse des protéines par la méthode du Western blot.....	29
6.1	Extraction des protéines .....	29
6.2	Dosage de la concentration en protéines selon la technique de Pierce.....	29
6.3	Électrophorèse et transfert.....	30
7	Analyse de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel .....	31
7.1	Extraction de l'ARN total.....	31
7.2	Synthèse d'ADNc par rétro-transcription.....	32
7.3	PCR en temps réel .....	32

## **RÉSULTATS**

### **A. Étude de la régulation des récepteurs dans un modèle de kératinocytes en monocouches**

1	Déplétion du cholestérol dans un modèle de kératinocytes en monocouches .....	34
1.1	Transposition de la déplétion du cholestérol des modèles en RHE aux cultures de kératinocytes en monocouches .....	34
1.1.1	Analyse de la morphologie et de la viabilité cellulaires .....	34
1.1.2	Validation par RT-qPCR de l'expression de gènes différentiellement régulés en réponse à la déplétion du cholestérol .....	35

1.2	Effets de la déplétion du cholestérol sur l'expression des chaînes de récepteurs IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2.....	36
1.2.1	Analyse de l'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 .....	36
1.2.2	Analyse de l'expression protéique de IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 .....	37
1.3	Effets de la déplétion du cholestérol sur la localisation de IL-4R $\alpha$ dans des kératinocytes .	37
1.3.1	Analyse de la localisation cellulaire de IL-4R $\alpha$ en microscopie à épifluorescence .....	37
1.3.2	Analyse de la localisation cellulaire de IL-4R $\alpha$ en microscopie confocale .....	38
1.4	Visualisation des microdomaines lipidiques et de IL-4R $\alpha$ .....	39
1.5	Effets de la déplétion du cholestérol sur la signalisation des récepteurs aux IL-4 et IL-13 ..	40
1.5.1	Analyse de la signalisation de la voie JAK-STAT6.....	40
1.5.2	Analyse de la signalisation des voies des MAPKs p38 et ERK1/2 .....	41
2	Déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 dans un modèle de kératinocytes en monocouches .....	42
2.1	Transposition de la déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 du modèle en RHE aux cultures de kératinocytes en monocouches .....	42
2.1.1	Analyse de la morphologie et de la viabilité cellulaires .....	42
2.1.2	Analyse de l'expression en ARNm de gènes marqueurs de DA .....	42
2.2	Effets de la stimulation aux IL-4, IL-13 et IL-25 en condition de déplétion du cholestérol sur la signalisation cellulaire : Quelques pistes.....	43
2.2.1	Analyse de la signalisation de la voie JAK-STAT6.....	44
2.2.2	Analyse de la signalisation des voies des MAPKs p38 et ERK1/2 .....	44
 <b><u>B. Étude de la régulation des récepteurs dans un modèle d'épiderme humain reconstruit</u></b>		
1	Déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4-13-25.....	45
1.1	Validation du traitement par l'expression des gènes marqueurs de DA.....	46
1.2	Effets de la déplétion du cholestérol et stimulation par IL-4, IL-13, IL-25 sur l'expression des chaînes de récepteurs IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2 et IL-4R $\alpha$ .....	46
1.2.1	Analyse de l'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 .....	46
1.2.2	Analyse de l'expression protéique des IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2.....	47
2	Déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 au cours d'une cinétique de récupération/stimulation.....	47
2.1	Effets de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par les IL-4, IL-13, IL-25 sur l'expression des récepteurs des IL-4 et IL-13 .....	47
2.2	Effets de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par les IL-4, IL-13, IL-25 sur la signalisation cellulaire.....	48
2.2.1	Analyse de la signalisation de la voie JAK-STAT6.....	48
2.2.2	Analyse de la signalisation des voies des MAPKs p38 et ERK1/2 .....	48
2.3	Implication de ERK1/2 dans les réponses cellulaires activées suite à la déplétion du cholestérol et la stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25.....	49
2.4	Localisation de IL-4R $\alpha$ au sein d'un épiderme reconstruit sain et après déplétion du cholestérol .....	50

2.4.1	Localisation du récepteur au sein d'un équivalent épidermique humain sain et d'une peau humaine saine .....	51
2.4.2	Effet de la déplétion du cholestérol sur la localisation du récepteur au sein d'épidermes reconstruits déplétés du cholestérol.....	51

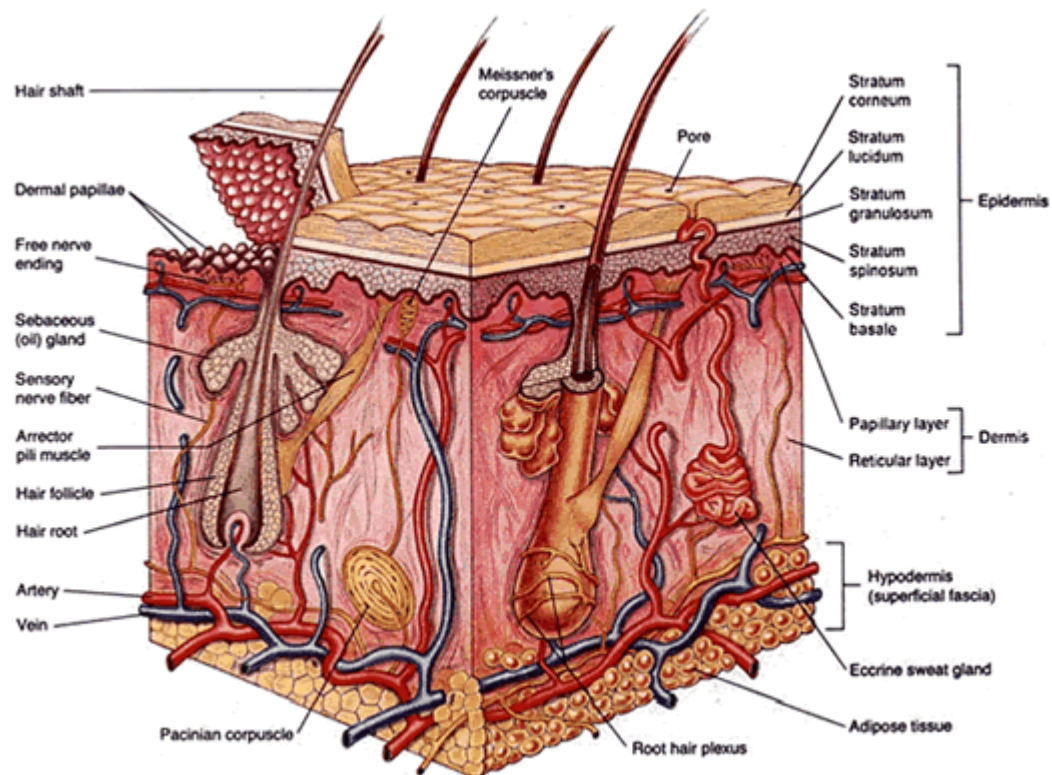
## **DISCUSSION & CONCLUSION**

1	Étude de la régulation des récepteurs des IL-4 et IL-13 dans des kératinocytes humains cultivés en monocouches .....	52
2	Étude de la régulation des récepteurs des IL-4 et IL-13 dans des épidermes reconstruits humains	56
3	Conclusion et perspectives .....	61

## **RÉFÉRENCES**

Références.....	64
-----------------	----





**Figure 1 : Représentation de la peau, composée de l'hypoderme, le derme et l'épiderme, et de ses annexes cutanées.** <http://www.lhsc.on.ca>

# **1 Physiologie de la peau**

## **1.1 Structure générale de la peau**

La peau forme l'organe le plus externe et le plus étendu de l'organisme ayant une surface approximative de 1,5 à 2 m<sup>2</sup>. Constituant un ensemble complexe et dynamique de cellules, tissus et éléments matriciels, la peau représente une barrière physique importante entre l'organisme et l'environnement tout en permettant son interaction avec celui-ci. D'un point de vue histologique, la peau est organisée en trois couches successives qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Fig 1).

### **1.1.1 L'hypoderme**

L'hypoderme est la région la plus profonde de la peau. Cette couche sous-cutanée innervée et hautement vascularisée est constituée d'un tissu conjonctif riche en lobules graisseux. Les adipocytes formant ces lobules sont des cellules spécialisées dans l'accumulation et le stockage de graisse sous forme de triglycérides et acides gras, servant ainsi de réservoirs énergétiques. La graisse sous-cutanée joue également un rôle de protection des tissus sous-jacents des chocs mécaniques et stress thermiques (Baroni et al., 2012; Freinkel & Woodley, 2001).

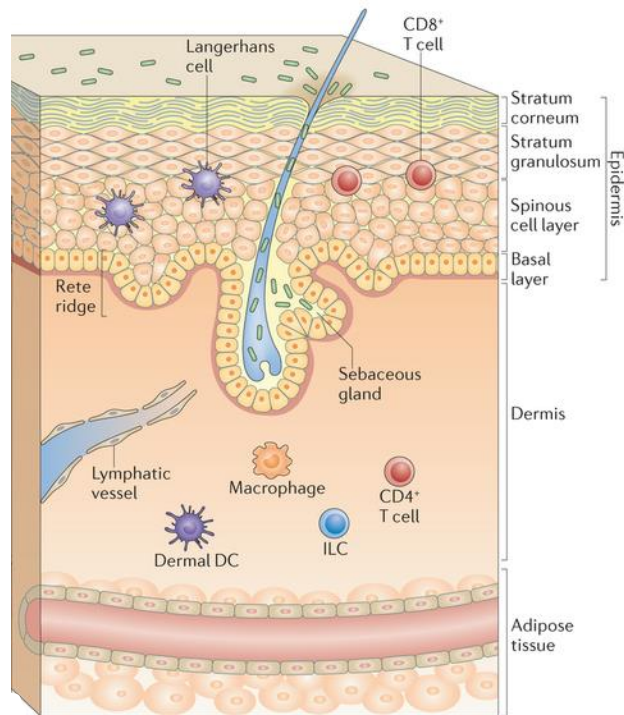
### **1.1.2 Le derme**

Le derme est une couche de tissu conjonctif comprenant principalement des fibres élastiques et du collagène, responsables de sa souplesse, de son élasticité et de sa résistance. Cette matrice extracellulaire est synthétisée et renouvelée par les **fibroblastes**, principal type cellulaire de cette couche. Le derme est hautement vascularisé (transport de nutriments) et riche en terminaisons nerveuses et en vaisseaux lymphatiques. Il comprend également une série d'annexes cutanées dont des glandes sébacées et sudoripares ainsi que des follicules pileux.

Le derme est constitué de deux régions superposées qui se distinguent par l'organisation de leur tissu conjonctif et leur densité cellulaire, le derme réticulaire et le derme papillaire (Freinkel & Woodley, 2001). **Le derme réticulaire**, en contact avec l'hypoderme, se compose d'un réseau dense de fibres élastiques et de collagène imbriquées. Ce tissu, innervé par les corpuscules de Vater-Pucini et Ruffini, comprend également les appendices cutanés. **Le derme papillaire**, couche la plus superficielle du derme se structurant en papilles, renforce la jonction dermo-épidermique. Il est constitué d'un ensemble lâche de fibres organisées et est innervé par des corpuscules de Wagner-Meissner. La population cellulaire y est plus abondante et décroît progressivement vers les régions dermiques plus profondes (Freinkel & Woodley, 2001).

Le derme, en plus de sa composition en cellules stromales, contient des cellules impliquées dans l'immunité telles que les cellules dendritiques, les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les cellules lymphoïdes innées (Fig 2). Ces populations cellulaires sont dynamiques et subissent des modifications spécifiques lors d'une réponse immunitaire (Pasparakis, Haase, & Nestle, 2014).

**Les cellules dendritiques dermiques (dDCs)**, dérivées de cellules progénitrices hématopoïétiques, sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs, jouant ainsi le rôle de sentinelle du système immunitaire. Ces cellules phagocytaires sont très mobiles dans le derme afin de détecter et capturer les antigènes. Elles migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques drainants où elles initient des réponses immunitaires en activant des



**Figure 2 : Les cellules immunitaires au sein de la peau.** Le derme est peuplé par des cellules dendritiques (DC) dermiques, des macrophages, des lymphocytes T conventionnels ( $T\alpha\beta$ )  $CD4^+$  et une petite population de cellules lymphoïdes innées (ILCs). Les principales cellules immunitaires présentes au sein de l'épiderme sont les lymphocytes  $T\alpha\beta$   $CD8^+$  et les cellules de Langerhans. Adapté à partir de Pasparakis et al., 2014.

lymphocytes T spécifiques (immunité adaptative) (Tay, Roediger, Tong, Tikoo, & Weninger, 2014). Cette activation se fait par l'intermédiaire de la reconnaissance entre le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) portant le peptide antigénique et le récepteur des cellules T (TCR) (Clark & Kupper, 2005). En absence d'inflammation (steady-state), elles sont également impliquées dans la tolérance périphérique du soi. La migration des dDCs à partir de la peau s'effectue alors de manière constitutive (Nestle, Di Meglio, Qin, & Nickoloff, 2009; Tay et al., 2014).

**Les macrophages** sont issus de la différenciation des monocytes sanguins lorsque ceux-ci migrent dans le derme. Ils présentent de nombreuses fonctions au sein de la peau dont principalement la phagocytose de pathogènes et de cellules apoptotiques (Freinkel & Woodley, 2001). De par cette fonction, les macrophages constituent un mécanisme de défense de l'immunité innée. Ils secrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires dont des chémokines, ces dernières contribuant au recrutement de cellules immunitaires spécifiques au site de lésion ou d'infection (Tay et al., 2014). Ils se comportent également comme des cellules présentatrices d'antigène contribuant ainsi à l'immunité adaptative (Freinkel & Woodley, 2001).

**Les mastocytes**, cellules dérivées de précurseurs hématopoïétiques, sont localisés à proximité des vaisseaux sanguins. Ces cellules granuleuses jouent un rôle important dans le processus inflammatoire et dans les réactions d'hypersensibilité de type I (immédiate). Ils expriment des récepteurs de haute affinité aux IgE (FcεRI) qui peuvent être activés par ces mêmes immunoglobulines complexées à un allergène spécifique. Cette activation entraîne la dégranulation et la sécrétion par les mastocytes d'une série de médiateurs pro-inflammatoires (Kaplan, Igyarto, & Gaspari, 2012).

**Les lymphocytes T** sont présents en grand nombre au sein de la peau avec une localisation préférentielle des CD4<sup>+</sup> dans le derme et des CD8<sup>+</sup> dans l'épiderme (Mueller, Zaid, & Carbone, 2014). Par leur expression du « lymphocyte-associated antigen » (CLA), un ligand des E-sélectines présentes à la surface de l'endothélium vasculaire, les lymphocytes CLA<sup>+</sup> ont la capacité de migrer au sein de la peau et d'y assurer leur fonction protectrice (Clark & Kupper, 2005).

**Les cellules lymphoïdes innées (ILCs)** sont des cellules lymphoïdes capables de coordonner immunité et inflammation au niveau de barrières tissulaires par leur production de cytokines. Elles sont divisées en 3 sous-groupes sur base des facteurs de transcription impliqués dans leur différenciation et des cytokines exprimées : ILC1s, ILC2s et ILC3s (Pasparakis et al., 2014). Les ILC2s, localisées dans le derme, ont été retrouvées en grande proportion dans les lésions atopiques. Elles produisent des cytokines Th2 telles que les IL-4 et IL-13 en réponse aux IL-33, IL-25 et TSLP (Salimi & Ogg, 2014).

### **1.1.3 L'épiderme**

L'épiderme est la couche tissulaire la plus externe de la peau. Cet épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK) est d'une part, en contact direct avec l'environnement et d'autre part, séparé du derme par la lame basale, constituée de protéines de la matrice extracellulaire (Candi, Schmidt, & Melino, 2005; Freinkel & Woodley, 2001) et correspondant à la jonction dermo-épidermique. L'épiderme, dont l'épaisseur peut varier en fonction de sa localisation, est continuellement renouvelé. Son renouvellement complet s'effectue sur une période d'environ 28 jours (Baroni et al., 2012) et repose sur un équilibre entre des processus de prolifération cellulaire et de desquamation. L'épiderme est un tissu avasculaire composé de

quatre types cellulaires : les kératinocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes (Nestle et al., 2009).

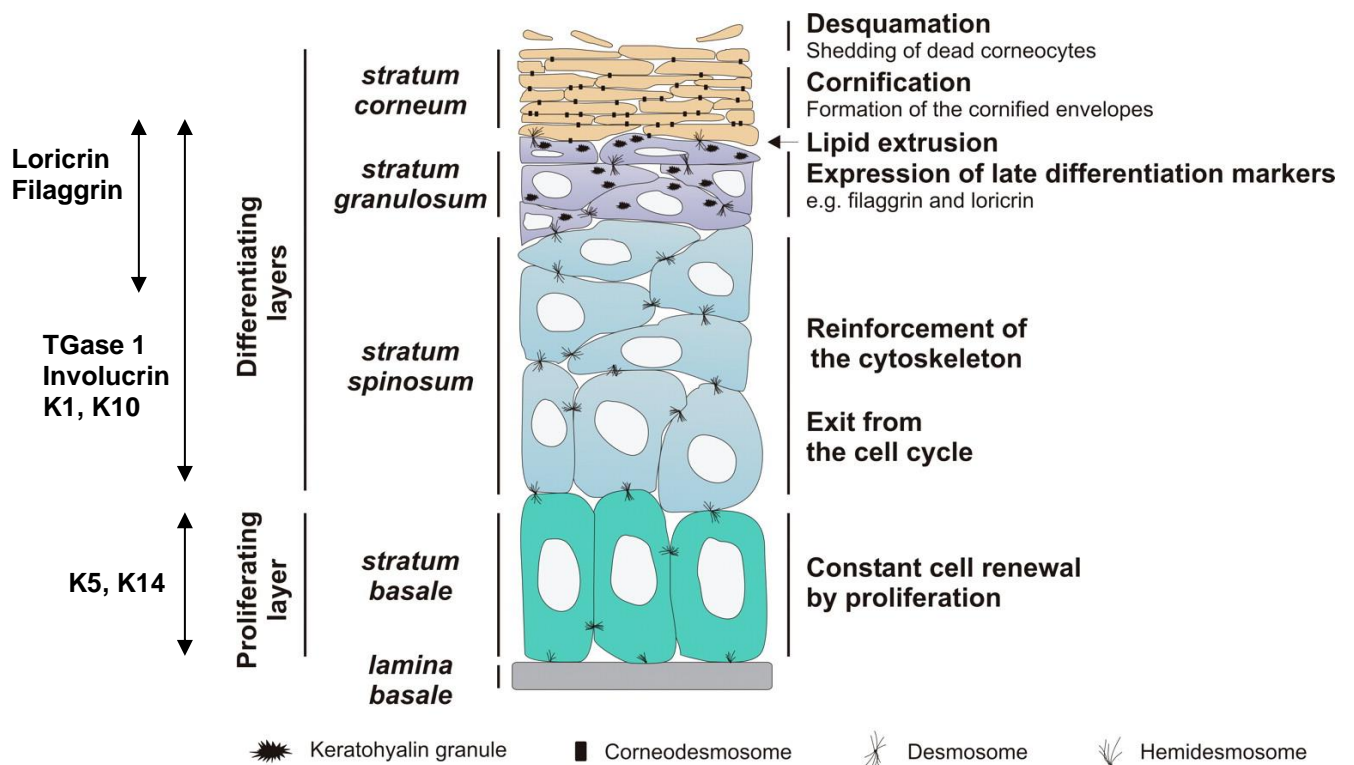
**Les kératinocytes** représentent la population cellulaire majoritaire (90-95%) de l'épiderme. Ils ont la capacité de synthétiser des filaments de kératine, protéines très résistantes du cytosquelette participant à l'intégrité structurelle de l'épiderme (Freinkel & Woodley, 2001). De par leur position stratégique dans les couches les plus superficielles de la peau, les kératinocytes participent à l'initiation de l'inflammation. En effet, par l'expression de récepteurs de l'immunité innée spécifiques, les « pattern-recognition receptors » PRRs (TLRs et NLRs respectivement pour « Toll-like receptors » et « NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain) leucine rich containing protein »), les kératinocytes perçoivent la présence de microorganismes et d'autres facteurs de stress environnementaux. En réponse à ces signaux, les kératinocytes activés sécrètent des peptides antimicrobiens (AMPs) ainsi qu'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires dont des chémokines permettant de recruter différents types cellulaires dans la peau et de moduler ainsi la réponse immunitaire (De Benedetto, Agnihotri, McGirt, Bankova, & Beck, 2009; Nestle et al., 2009; Pasparakis et al., 2014). Ce rôle des kératinocytes dans la régulation immunitaire est mis en évidence dans des maladies inflammatoires de la peau où des voies de signalisation pro-inflammatoires sont activées dans l'épiderme des patients (Pasparakis et al., 2014).

**Les mélanocytes** sont dérivés de cellules de la crête neurale lors du développement fœtal (Freinkel & Woodley, 2001).

Ces cellules spécialisées dans la pigmentation de la peau sont localisées au niveau de la couche basale et émettent des prolongements dendritiques entre les kératinocytes des couches supérieures. Les mélanocytes produisent de la mélanine, pigment responsable de la couleur de la peau jouant une fonction protectrice de l'ADN contre les rayons UV. La mélanine est synthétisée et accumulée au sein d'organites spécifiques, les mélanosomes. Lors d'une exposition aux UV, les mélanocytes transfèrent les mélanosomes aux kératinocytes adjacents par le biais de leurs dendrites. Une fois transférés, les mélanosomes se distribuent dans la région périnucléaire, protégeant ainsi les noyaux des cellules épidermiques (Ando et al., 2012; Baroni et al., 2012; Freinkel & Woodley, 2001).

**Les cellules de Langerhans (LCs)** constituent une population de cellules dendritiques (DCs) immunocompétentes, dérivées de la différenciation de cellules de la moelle osseuse (monocytes). Elles sont établies d'une manière régulière entre les kératinocytes des couches suprabasales de l'épiderme. Suite à la capture d'antigènes, les LCs deviennent mobiles et gagnent les ganglions lymphatiques drainant la peau afin de présenter les antigènes traités aux lymphocytes T spécifiques et initier des réponses immunitaires (Baroni et al., 2012; Freinkel & Woodley, 2001; Nestle et al., 2009; Pasparakis et al., 2014; Tay et al., 2014). Les peaux de patients atteints de dermatite atopique présentent une accumulation d'une population de DCs distinctes des LCs, les **cellules dendritiques épidermiques inflammatoires (iDECs)** (Nestle et al., 2009; Pasparakis et al., 2014).

**Les cellules de Merkel** sont localisées dans la couche basale de l'épiderme et assurent une fonction de mécanorécepteur par leur association à des fibres nerveuses sensorielles afférentes. Elles permettent ainsi la détection de nombreux stimuli liés au toucher tels que la perception des textures et des formes (Freinkel & Woodley, 2001; Maksimovic et al., 2014; Morrison, Miesegaes, Lumpkin, & Maricich, 2009).



**Figure 3 : Processus de différenciation des kératinocytes.** Les kératinocytes de la couche basale expriment des kératines 5 et 14 qui sont des marqueurs de prolifération. Dans les couches suprabasales, les kératinocytes entrés en différenciation expriment les kératines 1 et 10 ainsi que l'involucrine et la transglutaminase 1 (TGase 1), des marqueurs tardifs de la différenciation. Les kératinocytes expriment l'involucrine et la loricrine (marqueurs tardifs) à partir de la couche granuleuse. Adapté à partir de Denecker et al., 2008.

## **1.2 La différenciation épidermique**

Les kératinocytes subissent périodiquement un processus de différenciation épidermique terminale et une mort cellulaire programmée (Eckhart, Lippens, Tschachler, & Declercq, 2013). Cette différenciation progressive, appelée la kératinisation, permet la formation de la barrière épidermique de la peau (Candi et al., 2005). Au cours de ce processus, la migration des kératinocytes vers les couches supérieures de l'épiderme s'accompagne d'une série de modifications morphologiques et métaboliques étroitement régulées. Ces modifications morphologiques et l'expression de marqueurs spécifiques permettent de distinguer 4 couches de cellules épithéliales composant l'épiderme et correspondant à des stades de différenciation différents : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Candi et al., 2005; Eckhart et al., 2013; Nestle et al., 2009; Simpson, Patel, & Green, 2011) (Fig 3).

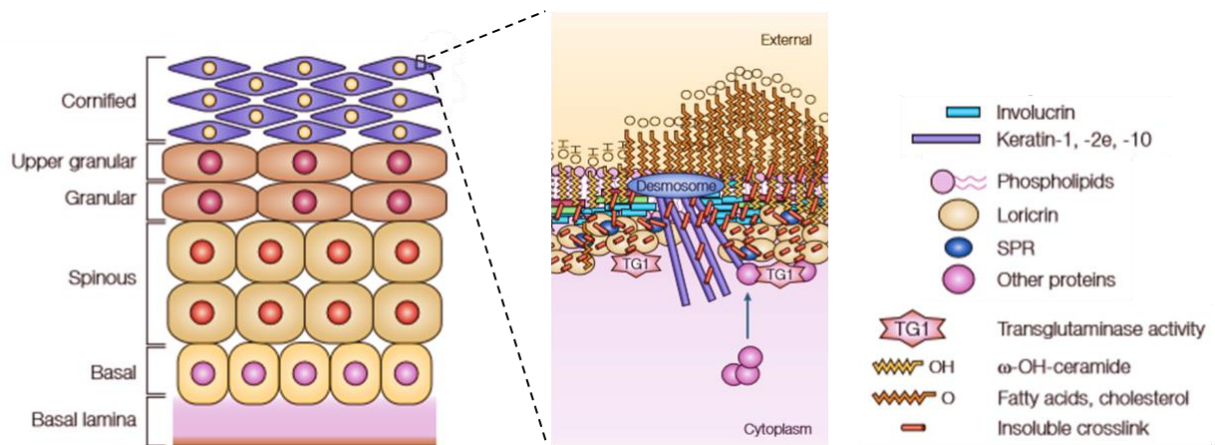
### **1.2.1 Les différentes couches de l'épiderme**

**La couche basale** est constituée d'une seule assise de kératinocytes prolifératifs, assurant l'auto-renouvellement de l'épiderme. Les kératinocytes de cette couche adhèrent à la lame basale grâce aux hémidesmosomes et sont associés entre eux par des desmosomes. Deux populations de kératinocytes sont distinguées au sein de cette couche : des cellules souches (10%) dont la prolifération est lente mais continue et des cellules d'amplification transitoire dont la prolifération est rapide mais limitée. Ces cellules d'amplification transitoire entament un processus de différenciation épidermique lorsqu'elles quittent le cycle cellulaire. La perte de leur potentiel prolifératif est associée à une perte de leur capacité d'adhérence à la lame basale. Elles commencent alors à migrer vers les couches suprabasales (Freinkel & Woodley, 2001; Indra & Leid, 2011; Segre, 2006; Watt, 1998). Les kératinocytes de la couche basale expriment principalement les kératines 5 (K5) et 14 (K14) qui sont généralement utilisées comme marqueurs de cellules prolifératives (Candi et al., 2005).

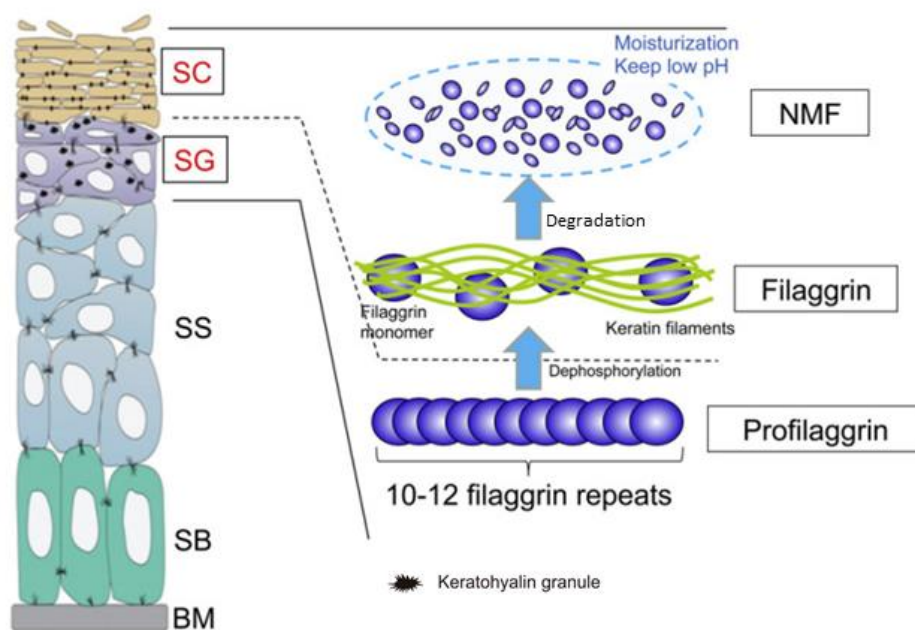
**La couche épineuse** est une couche intermédiaire de l'épiderme composée de 2 à 3 assises de cellules polyédriques qui s'aplatissent progressivement au fur et à mesure de leur migration vers les couches supérieures où apparaissent des nouveaux organites, les corps lamellaires (corps d'Odland) (Candi et al., 2005; Freinkel & Woodley, 2001). Les kératinocytes sont liés entre eux par des desmosomes assurant la cohésion de la couche épineuse. Les expressions des K5 et K14 sont remplacées par celles des kératines 1 (K1) et 10 (K10), utilisées comme marqueurs type de différenciation au niveau des couches suprabasales (Simpson et al., 2011).

**La couche granuleuse** est constituée de 2 à 3 assises de cellules aplaties dont le noyau commence à entrer en pycnose. Les kératinocytes granuleux sont associés entre eux par le biais de jonctions serrées, constituant ainsi une barrière contre la perte de fluide et la pénétration de pathogènes (Simpson et al., 2011; Tsuchisaka, Furumura, & Hashimoto, 2014). Cette couche est associée à une accumulation de granules de kératohyaline au sein du cytoplasme des kératinocytes. Ces granules contiennent de la profilaggrine, précurseur de la filaggrine, ainsi que de la loricrine. Suite à la déphosphorylation et la protéolyse de la profilaggrine, la filaggrine libérée permet l'agrégation des filaments intermédiaires de kératine, facilitant l'aplatissement des cellules (Brown & McLean, 2012; Candi et al., 2005; Denecker, Ovaere, Vandenabeele, & Declercq, 2008; Kubo, Nagao, & Amagai, 2012). La filaggrine, la loricrine ainsi que d'autres protéines exprimées par les kératinocytes granuleux, l'involucrine et des petites protéines riches en proline (SPRs), sont codées au sein du complexe de différenciation épidermique (« EDC ») sur le chromosome humain 1q21 (Kim, 2005). Toutes ces protéines sont des composants essentiels de l'enveloppe cornée dont la formation est amorcée à l'interface des couches granuleuse et cornée (Freinkel & Woodley,





**Figure 4 : Composition de l'enveloppe cornée.** Les protéines intracellulaires de l'enveloppe cornée sont liées entre elles sous l'action des transglutaminases pour former un réseau protéique dense sous la membrane plasmique. Les lipides extrudés des corps lamellaires à la surface cellulaire sont liés à l'enveloppe protéique. Adaptée à partir Candi et al., 2005.



**Figure 5 : Rôle de la filaggrine dans la formation de la barrière épidermique.** La profilaggrine contenue au sein des granules de kératohyaline se fragmente en molécules de filaggrine suite à sa déphosphorylation. Les molécules de filaggrine s'agrègent avec les filaments de kératines pour former une matrice dense composant en partie l'enveloppe cornée. Les monomères de filaggrine sont dégradés en facteurs d'hydratation (NMF), nécessaires pour le maintien de l'hydratation de la peau et d'un pH faible. BM = Basement membrane, SB = Stratum Basale, SS = Stratum Spinosum, SG = Stratum Granulosa, SC = Stratum Corneum. Adapté à partir de Kabashima, 2013.



2001). À cette frontière, les corps lamellaires (ou corps d'Odland) dans lesquels sont synthétisés et stockés des lipides ainsi que des hydrolases acides fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leur contenu dans l'espace intercellulaire. Les lipides y subissent alors des modifications par l'action des hydrolases acides (Candi et al., 2005) et s'organisent en lamelles à la surface des cellules de la couche cornée pour former une enveloppe lipidique composée de céramides (50%), cholestérol (25%), acides gras (15%) (Feingold & Elias, 2014; Proksch, Brandner, & Jensen, 2008). Cette matrice lipidique extracellulaire, par ses propriétés hydrophobes, permet principalement d'éviter la perte d'eau transépidermique (TEWL) et l'entrée de substances ou particules nocives telles que des toxines, allergènes et micro-organismes pathogènes (Eckhart et al., 2013; Elias & Wakefield, 2014; Feingold & Elias, 2014).

**La couche cornée**, en contact direct avec l'environnement, est composée de plusieurs assises de cellules mortes pavimenteuses et anucléées, les cornéocytes. Il s'agit de kératinocytes complètement différenciés enrichis en filaments de kératine agrégés par la filaggrine et dont les noyaux et organites ont été dégradés. La couche cornée présente une épaisseur qui peut varier d'une dizaine d'assises cellulaires (haut du bras) à plusieurs centaines (paumes des mains et plantes de pied). La formation de cette couche, souvent comparée à un modèle en « briques et mortier », fait suite à la dernière étape de la kératinisation. Les cornéocytes (« briques »), connectés par les cornéodesmosomes, sont insérés dans la matrice lipidique extracellulaire (« mortier ») et entourés d'une enveloppe protéique, sous-jacente à la membrane plasmique des cornéocytes (Freinkel & Woodley, 2001). Cette enveloppe est formée par la réticulation de l'involucrine et de la loricrine, composants protéiques majeurs de la couche cornée, sous l'action de la transglutaminase (TGase-1) qui catalyse la formation de ponts isopeptidiques très stables. Les réseaux d'involucrine et de loricrine sont incorporés à la matrice sous-membranaire de fibres de kératine alignées grâce à la filaggrine et reliées de manière covalente par l'action de la TGase-1 qui associe également les SPRs à la loricrine (Candi et al., 2005; Eckert, Sturniolo, Broome, Ruse, & Rorke, 2005; Eckhart et al., 2013; Simpson et al., 2011). La structure protéique rigide de cette « enveloppe cornée » permet l'attachement covalent des lipides externalisés organisés autour des cornéocytes (Candi et al., 2005) (Fig 4). Les cornéocytes les plus superficiels sont détachés de l'épiderme, suite à l'action de protéases à sérine (kallicréines (KLK)) sécrétées préalablement à partir des corps lamellaires (Eckhart et al., 2013; Elias & Wakefield, 2014). Ce processus de desquamation est contrebalancé par la prolifération des cellules de la couche basale. Le maintien de cet équilibre desquamation/prolifération des kératinocytes est essentiel pour l'homéostasie de l'épiderme (Freinkel & Woodley, 2001).

La présence de l'enveloppe cornée protéique et lipidique représente une véritable barrière physique contre la perte transépidermique de fluides dont l'eau corporelle (TEWL) et la pénétration d'allergènes, de micro-organismes et autres molécules éventuellement présentes dans l'environnement de l'organisme. D'autre part, des facteurs d'hydratation de la peau (« natural moisturizing factors » NMFs) générés par la dégradation de la filaggrine favorisent aussi la rétention d'eau et la flexibilité de la couche cornée (Brown & McLean, 2012; Cork et al., 2009) mais participent aussi à acidifier la surface épidermique (Kabashima, 2013; Kubo et al., 2012) (Fig 5). Au niveau des couches granuleuse et cornée, l'involucrine, la loricrine, la filaggrine ainsi que la TGM-1 sont utilisés comme marqueurs de différenciation tardive.

### **1.2.2 Gradient de pH**

La présence d'un gradient de pH décroissant de l'intérieur vers la surface au sein de l'épiderme contribue au développement d'une barrière cornée fonctionnelle par ses implications dans la régulation de la desquamation et dans la génération de la matrice

lamellaire lipidique. Un pH acide au niveau des couches les plus externes est nécessaire pour l'activité d'enzymes localisées dans la couche cornée telles que les protéases à sérine (KLK 5 et 7) impliquées dans la protéolyse des cornéodesmosomes (Candi et al., 2005; Eckhart et al., 2013). En plus d'être nécessaire au maintien de l'homéostasie de la barrière épidermique, ce manteau acide représente un obstacle contre de nombreuses infections (Cork et al., 2009).

### **1.2.3 Calcium**

La différence de concentration en calcium, rencontrée au sein de couches de l'épiderme, joue un rôle important dans le développement de l'épiderme par ses implications dans la prolifération, la différenciation, ainsi que dans l'adhésion des kératinocytes (Cork et al., 2009; Proksch et al., 2008). La concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  est élevée dans la couche granuleuse, alors qu'elle est faible dans les couches inférieures et cornée. L'augmentation de la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne l'exocytose des corps lamellaires, ainsi que l'activation de la TGM-1, enzyme-clé dans la formation du réseau protéique (Proksch et al., 2008). Le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est un facteur indispensable pour la formation des jonctions intercellulaires et est ainsi responsable en partie de la cohésion cellulaire.

### **1.2.4 Les jonctions intercellulaires**

Les kératinocytes sont liés entre eux par différents types de jonctions intercellulaires : les jonctions d'adhérence, les desmosomes et les jonctions serrées. Ces jonctions sont essentielles pour empêcher la perte d'eau transépidermique TEWL ainsi que le passage d'allergènes dans les espaces intercellulaires. Elles contribuent à la signalisation intercellulaire et à la régulation transcriptionnelle (Cork et al., 2009; Simpson et al., 2011).

**Les jonctions d'adhérence** (« *adherens junctions* ») sont composées principalement de cadhérines et connectent les filaments d'actine des cellules voisines. Ce type de jonction, retrouvé dans les différentes couches de l'épiderme, joue un rôle important dans la stabilité mécanique de l'épiderme (Kaiser et al., 1993; Niessen, 2007).

**Les desmosomes** sont des structures qui contiennent des cadhérines (desmoglénines, desmocollines) et lient les filaments de kératine des cellules adjacentes. Par la mise en place de ces adhésions intercellulaires, les desmosomes assurent la cohésion tissulaire. Il existe des types particuliers de desmosomes. Au niveau de la couche basale, les hémidesmosomes contiennent des intégrines et permettent l'adhérence des kératinocytes à la membrane basale. Au niveau de la couche cornée, les cornéodesmosomes lient étroitement les cornéocytes les uns aux autres. Les cornéodesmosomes sont des structures desmosomales modifiées lors de la différenciation terminale qui sont dégradées au niveau de la couche cornée supérieure permettant ainsi la desquamation. Ils sont composés spécifiquement de la desmoglénine-1 (Dsg-1), desmocolline-1 (Dsc-1) et cornéodesmosine (Candi et al., 2005).

**Les jonctions étanches** (« *tight junctions* ») sont composées de protéines transmembranaires dont les claudines et les occludines ainsi que de protéines de la famille des « *zonula occludens* » (ZO) permettant de coupler le cytosquelette d'actine aux protéines transmembranaires (Simpson et al., 2011). Les composants protéiques de ces jonctions sont retrouvés principalement au niveau de la couche granuleuse (Tsuchisaka et al., 2014).

## **1.3 Les fonctions de la peau**

La peau assure une protection contre les agressions extérieures et les pertes excessives de fluides corporels. Elle intervient dans la cicatrisation et possède également d'autres fonctions

2.4.1	Localisation du récepteur au sein d'un équivalent épidermique humain sain et d'une peau humaine saine .....	51
2.4.2	Effet de la déplétion du cholestérol sur la localisation du récepteur au sein d'épidermes reconstruits déplétés du cholestérol.....	51

## **DISCUSSION & CONCLUSION**

1	Étude de la régulation des récepteurs des IL-4 et IL-13 dans des kératinocytes humains cultivés en monocouches .....	52
2	Étude de la régulation des récepteurs des IL-4 et IL-13 dans des épidermes reconstruits humains	56
3	Conclusion et perspectives .....	61

## **RÉFÉRENCES**

Références.....	64
-----------------	----

particulières telles que des fonctions sensorielles (sensibilité mécanique), métaboliques (synthèse de la vitamine D) et thermorégulatrices. En raison de son interface directe avec l'environnement, elle représente un site où les immunités innée et adaptative ont leur plus grande interaction (De Benedetto et al., 2009; Simpson et al., 2011). Une dérégulation de certaines de ces fonctions contribue à la mise en place de pathologies inflammatoires telles que la dermatite atopique.

## **2 La dermatite atopique (DA)**

### **2.1 Définition générale**

La DA est une dermatose inflammatoire chronique et récidivante dont la prévalence dans les pays industrialisés ne cesse d'augmenter (MC Gillespie & Brown, 2015; Weidinger & Novak, 2015). Cette maladie de la peau commune, aussi appelée eczéma atopique, affecte jusqu'à 20 % des enfants et 3 % des adultes (MC Gillespie & Brown, 2015). Elle est souvent associée au développement ultérieur d'autres affections atopiques telles que l'asthme et la rhinite allergique. Ce phénomène évolutif est appelé la marche atopique (Spergel & Paller, 2003). La DA est caractérisée par une inflammation de la peau qui s'accompagne de xérose (sécheresse cutanée et desquamation importante), de prurit (démangeaisons) et de lésions érythémateuses (rougeurs) ainsi qu'à une propension à développer des infections et une hypersensibilité cutanée. Ce phénotype clinique résulte d'une interaction complexe entre susceptibilité génétique et facteurs environnementaux, ainsi que de dysfonctions de la barrière épidermique et du système immunitaire (Guttman-Yassky, Dhingra, & Leung, 2013; Leyva-Castillo, Hener, Jiang, & Li, 2013; MC Gillespie & Brown, 2015; Pellerin et al., 2013).

La DA est associée à une altération de la fonction de la barrière épidermique qui se traduit notamment par une augmentation de la TEWL et du pH cutané, ainsi que de la susceptibilité aux pathogènes (Cork et al., 2009; Kubo et al., 2012; Weidinger & Novak, 2015). D'autre part, la DA est une maladie majoritairement médiée par une réponse Th2, avec un changement partiel vers une réponse Th1 lors de la phase chronique (Di Cesare, Di Meglio, & Nestle, 2008; Rudikoff, Cohen, & Scheinfeld, 2014). La phase aiguë de la maladie est caractérisée par la présence d'éosinophiles périphériques, une activation des mastocytes, une production élevée d'IgE sérique, une infiltration locale importante de lymphocytes associée à une surexpression de cytokines Th2, dont les IL-4 et IL-13 (Di Cesare et al., 2008; Hamid, Boguniewicz, & Leung, 1994; Hvid et al., 2011).

La DA affecte principalement les zones de flexion ainsi que le visage et le cou. La localisation et la morphologie des lésions de DA dépendent néanmoins de l'âge, avec une atteinte plus généralisée chez les nourrissons (Weidinger & Novak, 2015).

### **2.2 Histologie de la dermatite atopique**

La caractéristique histologique clé des lésions aiguës est la présence de spongiose au niveau des couches suprabasales de l'épiderme. La spongiose est associée à l'altération de la cohésion entre les kératinocytes, se traduisant par une augmentation de l'espace intercellulaire et la présence d'œdème intercellulaire (Bieber, 2010; Mihm, Soter, Dvorak, & Austen, 1976; Rudikoff et al., 2014; Trautmann et al., 2001). La phase aiguë présente un infiltrat inflammatoire dermique caractérisé par une prédominance de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, de cellules présentatrices d'antigènes et de mastocytes en dégranulation.

Alors que la spongiose devient moins nette, les lésions chroniques de DA sont marquées par une lichénification (hyperplasie épithéliale). L'épiderme présente ainsi de l'acanthose et de

l'hyperkératose parakératosique, correspondant respectivement à un épaissement de la couche épineuse et un épaissement de la couche cornée avec persistance des noyaux cellulaires. À ce stade de la maladie, de la fibrose peut être également observée.

La phase chronique présente un infiltrat inflammatoire dermique dominé par les macrophages et une accumulation périvasculaire de lymphocytes, moins nombreux que lors de la phase aiguë (Bieber, 2010; Mihm et al., 1976; Rudikoff et al., 2014; Trautmann et al., 2001).

### **2.3 Facteurs intervenant dans la dermatite atopique**

Le développement de la DA fait suite à des anomalies génétiques de protéines impliquées dans la différenciation terminale des kératinocytes ainsi que dans les réponses de l'immunité innée et adaptative (Malajian & Guttman-Yassky, 2015). À cette prédisposition génétique s'ajoute l'importance de l'environnement et du style de vie qui vont influencer le risque de manifester la maladie (Boguniewicz & Leung, 2011). Associées à ces facteurs, une altération de l'intégrité et de la fonction de la barrière épidermique ainsi que des dérégulations des réponses immunitaires sont interconnectées dans la pathogenèse de la DA (Levin, Fallon Friedlander, & Del Rosso, 2013). Les dérégulations immunitaires en faveur des réponses de type Th2 incluent également une sensibilité allergique augmentée et une réponse immunitaire innée défaillante. L'abondance de cytokines Th2 dans la peau contribue davantage à l'altération de la barrière épidermique et à une diminution des défenses innées de l'hôte (Brandt & Sivaprasad, 2011; Hanel, Cornelissen, Luscher, & Baron, 2013; Nomura et al., 2003). Par conséquent ces effets augmentent la susceptibilité aux infections et la déshydratation de la peau. Les réponses immunitaires, par l'action de TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) et IL-31, sur les terminaisons nerveuses cutanées, mènent à des démangeaisons (Brandt & Sivaprasad, 2011; Elmariah & Lerner, 2013; Werfel, 2009). Le grattage subséquent (facteur mécanique) fragilise davantage la fonction barrière épidermique et s'ensuit une activation du système immunitaire et une augmentation de l'inflammation. L'inflammation chronique, la dysfonction de la barrière épidermique, des anomalies immunologiques et une augmentation du taux IgE sont autant de caractéristiques types de la DA à fortes composantes génétique et environnementale (Bieber, 2010; Malajian & Guttman-Yassky, 2015).

#### **2.3.1 Facteurs génétiques**

##### **Barrière épidermique (EDC, protéases de la couche cornée et lipides lamellaires)**

Des mutations des gènes codés au sein de l'EDC ont été identifiées comme étant des facteurs prédisposant à la DA (Mischke, Korge, Marenholz, Volz, & Ziegler, 1996). Ce complexe contient des *clusters* de gènes codant pour une série de protéines impliquées dans la différenciation terminale des kératinocytes et nécessaires à l'intégrité de la barrière épidermique. Ces *clusters* comprennent notamment le gène de la filaggrine (*FLG*), codant la profilaggrine, ainsi que les gènes de la loricrine (*LOR*) et de l'involucrine (*IVL*).

Des mutations « perte de fonction » du gène *FLG* telles que R501X et 2282del4 représentent des facteurs de risque significatifs de développer la DA. Elles ont été identifiées au sein des populations européenne et asiatique, et corrélées avec des niveaux réduits de facteurs d'hydratation (NMFs), une augmentation du pH superficiel et une couche cornée défectueuse (Brown & McLean, 2012; Cork et al., 2009; Kubo et al., 2012; Morar, Willis-Owen, Moffatt, & Cookson, 2006; Peng & Novak, 2015).

Ces mutations du gène *FLG* ne sont ni nécessaires ni suffisantes au développement de la DA (Weidinger & Novak, 2015). En effet, elles ont été détectées chez approximativement 25 à 50% de patients atteints de DA (Akiyama, 2010), impliquant dès lors l'existence d'autres facteurs capables de produire l'altération de la barrière observée pendant la DA (Boguniewicz

& Leung, 2011). Ainsi la présence de mutations dans des gènes codant pour des protéines de l'enveloppe cornée, *LOR* et *IVL*, a été associée avec le développement de la DA (Gittler, Krueger, & Guttman-Yassky, 2013; Morar et al., 2006). Des mutations structurales des inhibiteurs de protéases à sérine, par exemple le gène de SPINK5 (Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5), entraîneraient également une augmentation de l'activité de protéases catalysant le clivage protéolytique des cornéodesmosomes et conduisant alors à une desquamation excessive des cornéocytes (Cork et al., 2009; Rudikoff et al., 2014; Voegeli et al., 2009). En plus de cette composante protéique, des modifications du profil des lipides localisés dans la couche cornée ont été détectées au niveau de sites affectés par la DA. Il a été rapporté qu'une diminution sélective du contenu en céramides de longues chaînes, corrélée avec une organisation lipidique moins dense, participait à l'altération de la barrière épidermique (Danso et al., 2014; Elias, 2014; Janssens et al., 2012). Des perturbations de la maturation des lipides (enzymes), ainsi que de leur sécrétion par les corps lamellaires, réduisent l'intégrité de la barrière (Elias, 2014).

### **Facteurs immunologiques**

Une prédisposition génétique peut mener à développer des niveaux élevés d'IgE, d'éosinophiles et de lymphocytes Th2. Cette prédisposition favorise ainsi le déclenchement de réponses immunitaires pro-Th2 (Rudikoff et al., 2014).

La présence de gènes impliqués dans les mécanismes immunitaires et plus particulièrement au niveau de la signalisation de l'immunité innée et adaptative ainsi qu'au niveau de l'activation et la spécification des cellules T CD4<sup>+</sup> (De Benedetto et al., 2009; Weidinger & Novak, 2015) semble favoriser le développement de la DA.

Plusieurs gènes du système immunitaire inné ont été identifiés comme étant associés à la DA. Ces gènes codent pour des récepteurs PRRs NOD1, NOD2, TLR2 et CD14 et pour le peptide antimicrobien  $\beta$ -défensine qui joue un rôle important dans la défense immunitaire contre l'infection (Malajian & Guttman-Yassky, 2015). Chez les patients atteints de DA, des allèles spécifiques de ces gènes sont associés à une dysfonction des réponses de défense de l'hôte et à une augmentation de la susceptibilité à certains pathogènes (exemple : *Staphylococcus aureus*) (Barnes, 2010).

Au niveau du système immunitaire adaptatif, des gènes codant pour des cytokines Th2, des chémokines, des protéines régulatrices et des facteurs de transcription impliqués dans la réponse Th2 (*IL4*, *IL4RA*, *IL13*, *IL13RA1*, *TSLP*, *IL7R/TSLPR*, *CCR5*, *RANTES*, *SOCS3*, *GATA3*, *STAT6*) ont été identifiés comme étant à risque dans le développement de la DA (Boguniewicz & Leung, 2011; Gao et al., 2000; Gao et al., 2010; Malajian & Guttman-Yassky, 2015; Ziyab et al., 2013).

L'analyse du polymorphisme au niveau du locus 5q31 contenant les gènes pour les cytokines Th2 (*IL4*, *IL13*, *IL5*, *IL3* et *GM-CSF*) a révélé l'existence de plusieurs « single nucleotide polymorphisms » (SNPs) associés à des niveaux d'IgE sériques élevés et avec l'atopie en général ou la DA. Des SNPs présents à la fois dans le promoteur de *IL4* (C590T) et dans la séquence codante de l'*IL13* (R130Q), identifiés respectivement dans des populations américaines et japonaises (Oiso, Fukai, & Ishii, 2000; Shirakawa et al., 2000) et dans un groupe allemand (Heinzmann et al., 2000; X. Liu et al., 2004), altèrent l'expression de ces cytokines. En ce qui concerne le polymorphisme de *IL13*, le remplacement d'une arginine par une glutamine impliquerait différents changements fonctionnels tels qu'une affinité réduite pour IL-13R $\alpha$ 2 (Arima et al., 2002) et une signalisation améliorée via IL-13R $\alpha$ 1 (Vladich et al., 2005).





















Des SNPs pour *IL4RA* (Q551R et I50V), présent sur le chromosome 16p21, ont également été identifiés chez des patients atteints de DA, associés à une hyperproduction d'IgE et à une meilleure signalisation de IL-4 et IL-13 (activation de STAT6 augmentée) (Bieber, 2010; Novak, Bieber, & Leung, 2003; Oiso et al., 2000; Shirakawa et al., 2000). Des polymorphismes génétiques ont également été localisés au niveau de *IL13RA1* (A1398G - chromosome Xq24) et de *STAT6* (G2964A, C1570T (intron 18) - chromosome 12q13) (Gao et al., 2000).

Un autre cas de figure de dérégulation immunologique concerne la surexpression de cytokines Th2 telles que les IL-4 et IL-13. Celles-ci entraînent une altération de l'expression de nombreux gènes associés à la barrière épidermique et au système immunitaire.

### **2.3.2 Facteurs environnementaux**

Dans un contexte héréditaire de DA, plusieurs facteurs environnementaux contribuent au déclenchement ou à l'aggravation des manifestations atopiques (Cork et al., 2009).

L'utilisation de détergents et savons, en augmentant le pH de la surface de la peau, représente un de ces facteurs de risque. La modification du pH améliore l'activité de protéases de la couche cornée, ce qui a pour effet une exacerbation de la desquamation et donc une fragilisation de la barrière épidermique (Cork et al., 2009). Une intensification de l'activité protéolytique dans l'épiderme des patients de DA peut également être rencontrée suite à l'action de protéases exogènes produites par des acariens. Ces protéases exogènes sont normalement inhibées par la cystatin A sécrétée par les glandes sudoripares à la surface de la peau. L'expression altérée de la cystatin A, présente chez les patients atteints de DA, mène à une protection incomplète contre les protéases des acariens et ainsi à une détérioration de la barrière épidermique (Cork et al., 2009; Werfel, 2009).

Par ailleurs, les patients atteints de DA sont sujets à des complications infectieuses à cause d'une plus grande susceptibilité à être colonisés et infectés par des agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie sécrète des exotoxines ayant des propriétés superantigéniques qui vont stimuler l'activation des lymphocytes T et des DCs. Elle peut de cette manière participer à l'inflammation de la peau et contribuer à la chronicité de la maladie (Cork et al., 2009; Peng & Novak, 2015; Werfel, 2009).

D'autre part, certains facteurs environnementaux associés à un excès d'hygiène, une humidité réduite au sein des habitations et à des stress psychologiques ont été émis comme hypothèses pour expliquer la prévalence de la DA dans les pays industrialisés (Elias, 2014; Malajian & Guttman-Yassky, 2015; Okada, Kuhn, Feillet, & Bach, 2010).

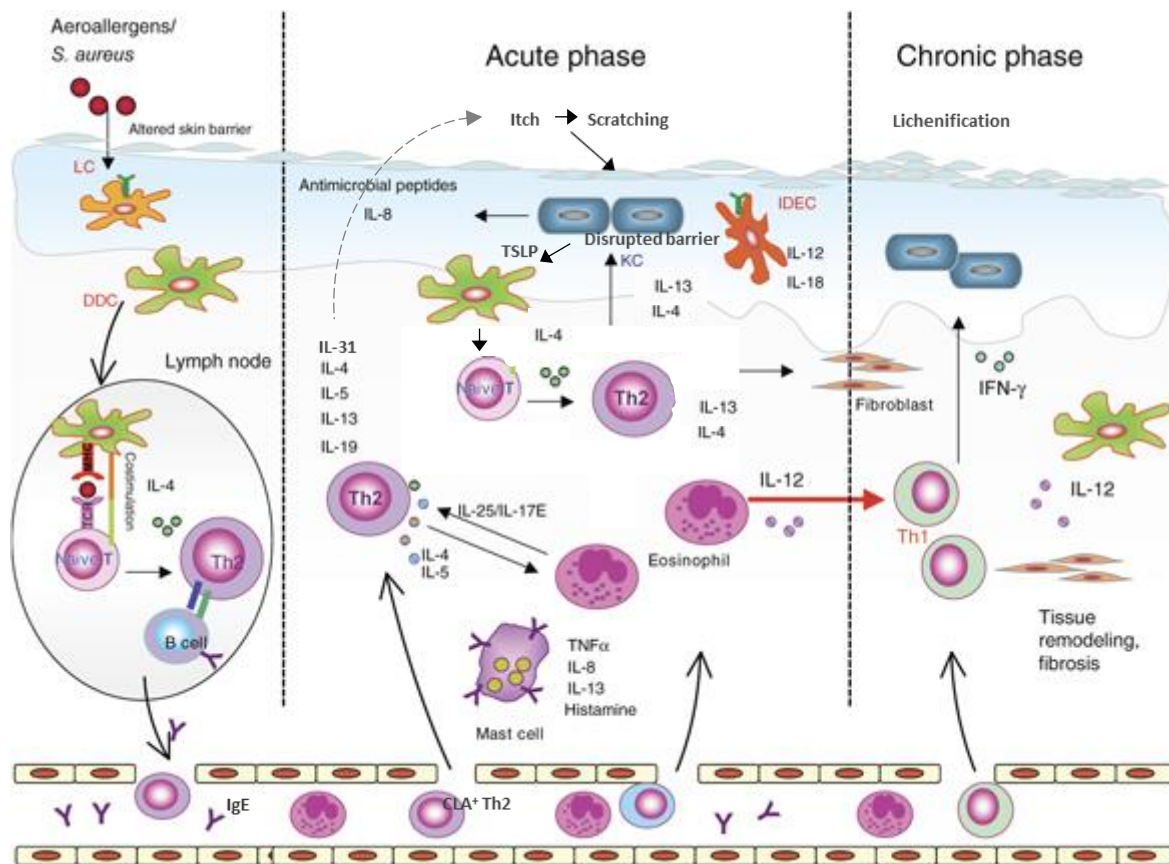
## **2.4 Pathophysiologie**

### **2.4.1 Mécanisme pathogénique**

La pathogenèse de la DA est attribuée à une interaction entre une barrière cutanée défectueuse et des anomalies du système immunitaire.

Deux hypothèses concernant le mécanisme pathogénique ont été proposées et restent encore débattues. La théorie « inside-outside » (immunocentrique) suggère qu'une activation du système immunitaire adaptatif est responsable de l'altération de la barrière épidermique, alors que la théorie « outside-inside » (cornéocentrique) soutient qu'une défectuosité intrinsèque dans l'épiderme élicite les réponses immunitaires via une pénétration augmentée de pathogènes et allergènes. Dans ce cas, le composant immunitaire ne serait pas « initiateur » mais plutôt un épiphénomène (Dhingra, Gulati, & Guttman-Yassky, 2013; Elias, 2014; Pellerin et al., 2013; Suarez-Farinas et al., 2011).





**Figure 6 : Mécanisme immunologique dans la DA.** Suite à la reconnaissance d'un antigène particulier, les cellules présentatrices d'antigène cutanées (cellules de langerhans (LC) et cellules dendritiques du derme (DDCs)) migrent dans les ganglions lymphatiques locaux où elles induisent la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2. Ces lymphocytes permettent le switch isotypique des lymphocytes B et la production d'IgE. Les cellules T CD4<sup>+</sup> Th2 expriment un récepteur CLA, leur conférant un tropisme pour l'épiderme enflammé. Les kératinocytes (KC) activés par la présence d'allergènes, de toxines produites par les micro-organismes ou de dégâts cellulaires occasionnées entre autre par le grattage sécrètent des cytokines inflammatoires dont TSLP. Celles-ci vont contribuer à la mise en place d'un environnement inflammatoire axé vers la réponse Th2 en facilitant l'extravasation des cellules Th2 (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2, éosinophiles, mastocytes) à l'intérieur de la peau et en favorisant la différenciation des lymphocytes Th2. À la différence de la phase aiguë, associée avec un nombre élevé de cellules Th2 au sein de la peau lésionnelle, la phase chronique est surtout associée à un infiltrat de cellules Th1. Ce passage d'un environnement pro-Th2 vers pro-Th1 est favorisé par la sécrétion d'IL-12 par les éosinophiles et cellules dendritiques épidermiques inflammatoires (iDECs). Les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN- $\gamma$ . MHC = Complexe majeur d'histocompatibilité. Adapté à partir de Di Cesare et al., 2008.

### 2.4.2 Mécanisme cellulaire

La DA se déroule selon un modèle biphasique, où une réponse Th2 avec des niveaux élevés des interleukines IL-4 et IL-13 ainsi que des chémokines polarisant une immunité type Th2 prédomine dans la phase aiguë de la maladie, alors que la réponse Th1 devient prépondérante dans la phase chronique.

Lors de la phase aiguë de la DA, l'altération de la barrière épidermique suite à l'interaction de facteurs génétiques, immunitaires ainsi que mécaniques (grattage) mène à une augmentation de l'infiltration d'antigènes. Ces derniers rencontrent des cellules présentatrices d'antigène cutanées (LCs, iDECs, dDCs) (Dhingra et al., 2013) qui migrent alors vers les ganglions lymphatiques où elles présentent les peptides antigéniques par le biais du CMH II aux cellules T CD4<sup>+</sup> naïves, permettant ainsi leur activation. La présence d'IL-4 sécrétée par les DCs oriente la différenciation des lymphocytes T vers un profil type Th2. Les cellules Th2 CLA<sup>+</sup> stimulent la commutation isotypique des lymphocytes B vers la production d'IgE (Di Cesare et al., 2008) et migrent vers la peau où elles produisent des cytokines Th2 dont les IL-4 et IL-13. Celles-ci ont été rapportées comme étant les principaux médiateurs de la réponse immunitaire Th2 (Rudikoff et al., 2014).

D'autre part, simultanément à ces processus et en réponse à des stimuli inflammatoires et mécaniques, les kératinocytes activés sécrètent des cytokines capables de stimuler l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales, facilitant ainsi l'extravasation des cellules inflammatoires au sein de la peau lésionnelle. Les kératinocytes activés expriment du « thymic stromal lymphopoietin » (TSLP), une cytokine contribuant à la mise en place d'un microenvironnement permissif Th2 (Jariwala, Abrams, Benson, Fodeman, & Zheng, 2011; Peng & Novak, 2015).

Conjointement aux kératinocytes, les lymphocytes Th2 ainsi que les DCs activées permettent entre autre, par leur production de cytokines, le recrutement des éosinophiles et mastocytes (Weidinger & Novak, 2015). Les IgE complexés aux allergènes se lient aux FcεRI présents à la surface des mastocytes et permettent ainsi la libération d'histamine, médiateur pro-inflammatoire et du prurit, aggravant la DA (Werfel, 2009). La dégranulation des mastocytes entraîne également la libération de cytokines inflammatoires telles que l'IL-4, IL-13 et IL-8 (T. Kawakami, Ando, Kimura, Wilson, & Kawakami, 2009).

Une expression élevée des FcεRI à la surface des DCs épidermiques, permet leur activation après liaison de l'IgE spécifique (Nestle et al., 2009; Peng & Novak, 2015). Les LCs sont impliquées dans la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Th2, alors que les iDECs stimulent la production de cytokines pro-Th1 (IL-12, IL-18) contribuant au passage à la phase chronique de la DA, associée à un environnement cellulaire Th1. Ce « switch » est également favorisé suite à la sécrétion d'IL-12 par les éosinophiles (Di Cesare et al., 2008; Werfel, 2009) recrutés et activés par IL-5 et IL-13 (Oyoshi, Larson, Ziegler, & Geha, 2010). L'activation des lymphocytes Th1 mène à la production d'IFN-γ induisant l'apoptose des kératinocytes et responsable de la chronicité des lésions (Rudikoff et al., 2014). Celles-ci vont mener progressivement à des processus de lichenification et de fibrose (Leung, Boguniewicz, Howell, Nomura, & Hamid, 2004; Oh et al., 2011) (Fig 6).

En plus des cytokines Th2 et Th1, les cytokines TSLP et IL-25 vont contribuer à la polarisation d'une réponse Th2 et ainsi participer à la surexpression des IL-4 et IL-13 majoritairement rapportées dans la littérature comme médiateurs clés de la dermatite atopique.

TSLP est un « master switch » pour l'inflammation allergique. Il s'agit d'une cytokine type IL-7 surexprimée par les kératinocytes de peau lésionnelle de patients atteints de DA en comparaison aux kératinocytes de peau saine. Cette expression est associée à l'activation des DCs qui induisent la différenciation des T CD4<sup>+</sup> naïves en T CD4<sup>+</sup> Th2 produisant un profil

type de cytokines, IL-4, IL-13, IL-5 et TNF- $\alpha$  (Y. J. Liu, 2006). En plus de son action sur la différenciation Th2 médiée par les DCs, TSLP exerce ses effets sur d'autres cellules telles que les mastocytes, les T CD4<sup>+</sup> et les éosinophiles, favorisant ainsi davantage l'inflammation associée à Th2. TSLP représente ainsi un acteur clé à l'interface cellules épithéliales-cellules dendritiques (Ziegler & Artis, 2010).

IL-25 contribue à la pathogenèse de la DA. Alors que la DA a longtemps été considérée comme étant un paradigme Th2/Th1, un nouveau sous-ensemble de cytokines inflammatoires de la famille des IL-17 contribue à sa pathogenèse (Di Cesare et al., 2008). Le membre le plus divergent de cette famille, par son faible pourcentage d'homologie de séquence (29 %) avec IL-17A (Gu, Wu, & Li, 2013) qui est le prototype des IL-17 (Kolls & Linden, 2004), est IL-17E (également nommée IL-25). IL-25 est exprimée par une variété de cellules incluant des cellules T CD4<sup>+</sup> présentant un profil Th2 (Kolls & Linden, 2004), des éosinophiles, des mastocytes, des DCs (Hvid et al., 2011) ainsi que par des cellules épithéliales (Gu et al., 2013; Hvid et al., 2011; Kolls & Linden, 2004; Y. H. Wang et al., 2007). Lors d'études réalisées sur des modèles murins, l'administration d'IL-25 induit une augmentation de l'expression des IL-4, IL-13 et IL-5 ainsi que des IgE sériques et des éosinophiles, soulignant son importance dans l'amplification des réponses inflammatoires de type Th2 (Fort et al., 2001). De plus, IL-25 possède la capacité d'induire l'expression d'IL-4R $\alpha$  à la surface des cellules Th2 mémoires et contribue entre autre à la polarisation Th2 en « up-régulant » le facteur de transcription GATA3 qui permet la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th2. IL-25 assure ainsi la maintenance des IL-4 et IL-13 (Y. H. Wang et al., 2007). L'analyse de l'effet de l'IL-25 sur des kératinocytes a montré que la présence de cette cytokine entraîne la diminution de l'expression de la filaggrine (Hvid et al., 2011). Dans le cadre de la signalisation, IL-25 exerce ses effets via un complexe de récepteurs IL-17RA et IL-17Rh1 et active la voie NF $\kappa$ B, ainsi que les MAPK ERK, p38 et JNK (Gu et al., 2013).

### **3 IL-4 et IL-13**

Les IL-4 et IL-13, sécrétées principalement par les mastocytes, les basophiles, les iLC2 et les lymphocytes Th2, sont impliquées dans la pathogenèse de nombreuses maladies atopiques, ainsi que dans la fibrose pulmonaire et le cancer (McCormick & Heller, 2015). Elles initient des processus inflammatoires de type Th2 en déclenchant entre autre la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th2, des cellules B en plasmocytes, et induisent le switch isotopique des IgE ainsi que l'expression de VCAM-1 et le recrutement des éosinophiles (A. L. Andrews, Holloway, Holgate, & Davies, 2006; Hershey, 2003; Peng & Novak, 2015). Toutes les cellules de l'organisme sont susceptibles de répondre à ces cytokines (McCormick & Heller, 2015).

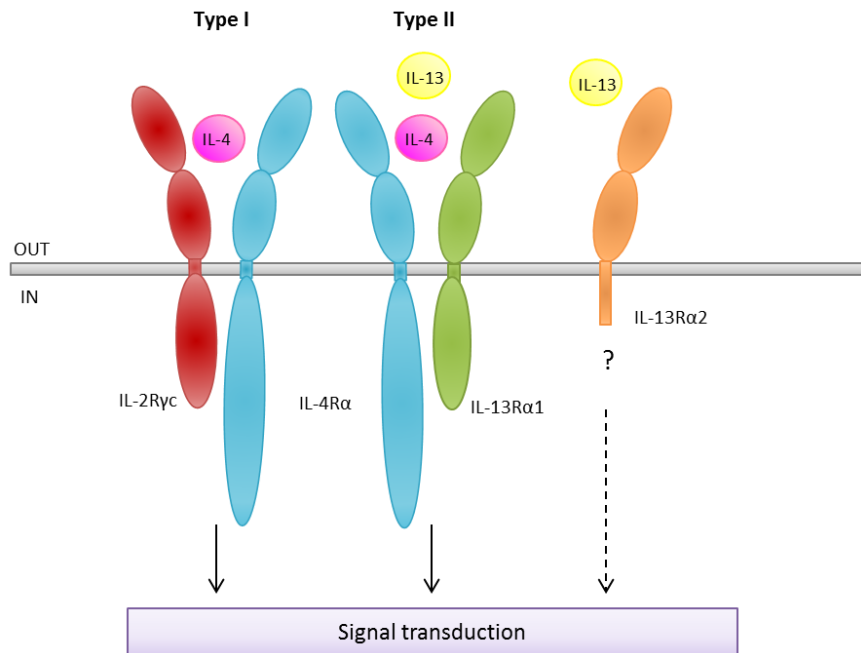
Les IL-4 et IL-13, structurellement liées, partagent des activités biologiques mais peuvent également induire des réponses fonctionnelles distinctes (M. D. David, Bertoglio, & Pierre, 2003; LaPorte et al., 2008).

#### **3.1 Récepteurs et voies de signalisation**

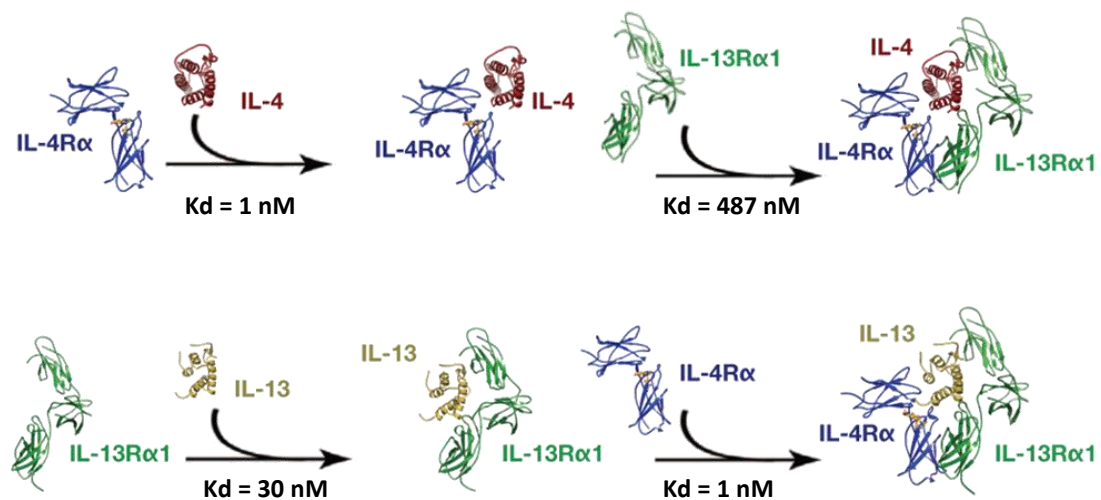
##### **3.1.1 Récepteurs : IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2**

##### **IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$ 1 : complexe de type II**

Les IL-4 et IL-13 opèrent via deux récepteurs hétérodimériques à la surface cellulaire, le type I et le type II, composés de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-4 (IL-4R $\alpha$  ; 140 kDa) associée à la chaîne  $\gamma$  commune du récepteur de l'IL-2 (IL-2R $\gamma$ c) ou à la chaîne  $\alpha$ 1 du récepteur de l'IL-



**Figure 7 : Récepteurs aux IL-4 et IL-13.** Le récepteur hétérodimérique de type I, non exprimé par les kératinocytes, est composé de IL-2R $\gamma$  et IL-4R $\alpha$  et lie uniquement l'IL-4. Le récepteur hétérodimérique de type II est composé de IL-4R $\alpha$  et IL-13R $\alpha$ 1. Ce complexe lie les IL-4 et IL-13. Le récepteur monomérique IL-13R $\alpha$ 2 lie uniquement l'IL-13. Les complexes de type I et II induisent la transduction du signal suite à la liaison de leur ligand alors que le rôle de IL-13R $\alpha$ 2 dans la signalisation de l'IL-13 est encore mal connue.



**Figure 8 : Séquence d'assemblage du complexe de récepteur de type II et affinité de liaison.** Adapté à partir de LaPorte et al., 2008.

13 (IL-13R $\alpha$ 1 ; 45-50 kDa). Le récepteur IL-4R $\alpha$  /IL-2R $\gamma$ c est responsable spécifiquement de la signalisation de IL-4, alors que le récepteur IL-4R $\alpha$  /IL-13R $\alpha$ 1 est commun aux deux signalisations IL-4 et IL-13 (Gandhi et al., 2014) (Fig 7). Ces différentes chaînes peuvent être soumises à un phénomène d'internalisation et se retrouver ainsi au sein d'endosomes précoces de signalisation (Gandhi et al., 2014; Platta & Stenmark, 2011). Contrairement aux cellules T et aux cellules B, les kératinocytes n'expriment pas la chaîne  $\gamma$  commune ( $\gamma$ c). Dès lors, dans ces cellules, les IL-4 et IL-13 apparaissent toutes deux capables d'induire leurs effets via le récepteur composé des chaînes IL-4R $\alpha$  and IL-13R $\alpha$ 1 (Wery-Zennaro, Letourneur, David, Bertoglio, & Pierre, 1999).

Chacune de ces cytokines interagit avec une sous-unité spécifique du récepteur avec une affinité précise. Leur liaison induit l'hétérodimérisation du récepteur et son activation consécutive (McCormick & Heller, 2015).

IL-4 se lie à IL-4R $\alpha$  avec une haute affinité (Kd ~subnanomolaire). Suite à cette interaction, le complexe IL-4/IL-4R $\alpha$  recrute IL-13R $\alpha$ 1 avec une faible affinité (Kd ~487 nM) et forme un récepteur fonctionnel à IL-4. Inversement, IL-13 se lie à IL-13R $\alpha$ 1 avec une faible affinité (Kd ~30 nM) en comparaison à l'interaction IL-4/IL-4R $\alpha$ . Le complexe IL-13/IL-13R $\alpha$ 1 ainsi formé recrute ensuite la sous-unité IL-4R $\alpha$  avec une affinité élevée (Kd ~30 pM) (Fig 8). Ainsi le recrutement de IL-4R $\alpha$  par le complexe IL-13/IL-13R $\alpha$ 1 permet d'augmenter l'affinité de liaison entre IL-13 et IL-13R $\alpha$ 1 et forme alors un récepteur fonctionnel à IL-13.

Le recrutement de IL-4R $\alpha$  par le complexe IL-13/IL-13R $\alpha$ 1 paraît dès lors plus favorable énergétiquement parlant et plus stable que le recrutement de IL-13R $\alpha$ 1 par le complexe IL-4/IL-4R $\alpha$  (A. L. Andrews et al., 2006; LaPorte et al., 2008; McCormick & Heller, 2015). Les IL-4 et IL-13 pourraient donc entrer en compétition pour, respectivement, la disponibilité des chaînes IL-4R $\alpha$  et IL-13R $\alpha$ 1 dans les cellules exprimant le récepteur de type II. En conséquence, les concentrations des IL-4 et IL-13 dans le milieu extracellulaire, ainsi que le niveau d'expression des chaînes de récepteurs, apparaissent comme des facteurs importants pour la signalisation via ce récepteur de type II (McCormick & Heller, 2015).

Les sous-unités IL-4R $\alpha$  et IL-13R $\alpha$ 1 sont exprimées en faible nombre sous des conditions homéostatiques. Néanmoins ces niveaux d'expressions sont modifiés en conditions inflammatoires (Hershey, 2003; LaPorte et al., 2008; McCormick & Heller, 2015), soutenant l'hypothèse d'un rôle potentiel du récepteur (IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1) dans les maladies inflammatoires chroniques. En effet, le composant IL-13R $\alpha$ 1 est surexprimé dans les kératinocytes de patients atteints de psoriasis et de DA (Wongpiyabovorn et al., 2003), comme il est constaté pour l'IL-4R $\alpha$  dans les cellules épidermiques psoriasiques (Cancino-Diaz et al., 2002).

### **IL-13R $\alpha$ 2**

Une autre chaîne de récepteur, la chaîne  $\alpha$ 2 du récepteur à IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), existe et lie IL-13 avec une plus grande affinité (Kd ~250 pM) que la chaîne IL-13R $\alpha$ 1 (Fig 7). La région cytoplasmique de IL-13R $\alpha$ 2 est plus courte et dépourvue de motifs apparents de signalisation (Daines & Hershey, 2002; Jiang, Harris, & Rothman, 2000; McCormick & Heller, 2015). Ce récepteur chaîne  $\alpha$ 2 a été rapporté diminuer spécifiquement la signalisation de IL-13, indiquant qu'il pourrait agir comme un récepteur « leurre » (A. L. Andrews et al., 2006; Hanel et al., 2013; Kelly-Welch, Hanson, Boothby, & Keegan, 2003; LaPorte et al., 2008; Sivaprasad et al., 2010; Zheng et al., 2003). Néanmoins des études ont rapporté une signalisation associée à ce récepteur dans un contexte de fibrose pulmonaire (Fichtner-Feigl, Strober, Kawakami, Puri, & Kitani, 2006; Hallett, Venmar, & Fingleton, 2012; McCormick &

Heller, 2015). IL-13R $\alpha$ 2 pourrait agir en coopération avec d'autres récepteurs ou protéines adaptatrices de signalisation (McCormick & Heller, 2015). Daines et al (2002) ont rapporté que IL-13R $\alpha$ 2 serait majoritairement présent sous forme de pools intracellulaires mobilisables en surface cellulaire. Une forme soluble de cette chaîne a également été identifiée chez la souris (Zhang et al., 1997).

De manière intéressante, l'expression d'IL-13R $\alpha$ 2 est régulée par les IL-4 et IL-13 dans les kératinocytes (Sivaprasad et al., 2010; Zheng et al., 2003) et une analyse du transcriptome par microdamier de kératinocytes isolés à partir de peaux de patients de DA révèle une expression élevée de ce récepteur (Lu et al., 2009).

### **3.1.2 Structure des chaînes IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$ 1**

Les récepteurs des IL-4 et IL-13 appartiennent à la famille des récepteurs aux interleukines de type I (famille de la chaîne- $\gamma$  (IL-2)) et présentent donc plusieurs de ses caractéristiques types : un motif conservé WSXWS, des domaines de fibronectine de type III (FN III) dans la partie extracellulaire N-terminale et des régions riches en proline (Box) dans le domaine intracellulaire C-terminale (Hanel et al., 2013; Hebenstreit, Wirnsberger, Horejs-Hoeck, & Duschl, 2006). La séquence consensus WSXWS, critique pour le repliement protéique, la liaison du ligand et la transduction du signal (Arima et al., 2002), est retrouvée au sein du domaine FN III proximal de la membrane plasmique (LaPorte et al., 2008). Le domaine intracellulaire contient des sites de liaison pour des partenaires protéiques variés impliqués dans la signalisation (Hanel et al., 2013). La région Box permet la liaison de tyrosine kinases de la famille « Janus kinase » (JAK), qui initient la signalisation de ces récepteurs dépourvus d'activité kinase intrinsèque (Hebenstreit et al., 2006; Hershey, 2003).

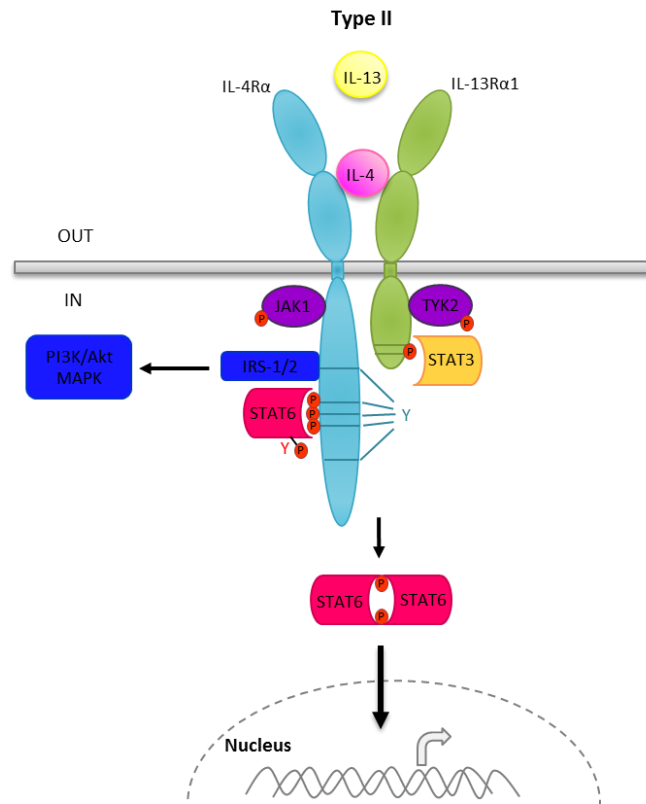
#### **IL-4R $\alpha$**

La chaîne IL-4R $\alpha$  contient, au niveau de son domaine cytoplasmique, une séquence Box-1 proche de la membrane essentiel pour le recrutement de JAK1 et cinq résidus tyrosines conservés Y497, Y575, Y603, Y631 et Y713, importants dans la signalisation associée à ce récepteur. C'est sous forme phosphorylée que ces tyrosines interagissent avec des molécules de la signalisation.

**Y497** fait partie du motif « Insulin/IL-4R » (I4R) nécessaire au recrutement des « Insulin Receptor Substrate » (IRS) -1/2 et critique pour la prolifération cellulaire dépendante de IL-4 et IL-13. Les **Y575, Y603 et Y631** constituent les sites d'ancrage de Signal Transducers and Activators of the Transcription (STAT) 6. Le dernier résidu tyrosine, **Y713**, présent au sein la séquence « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif » (ITIM), est important pour la régulation de l'activité du récepteur puisqu'il permet le recrutement de phosphatases « Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 » (SHP-1) (Hershey, 2003; Jiang et al., 2000; McCormick & Heller, 2015).

#### **IL-13R $\alpha$ 1**

La chaîne IL-13R $\alpha$ 1 contient, comme IL-4R $\alpha$ , une séquence Box-1 au niveau de son domaine cytoplasmique nécessaire au recrutement des JAK2 ou TYK2 et deux résidus tyrosine Y402 et Y405. Ceux-ci peuvent servir de sites d'ancrage pour des intermédiaires de la signalisation (Hershey, 2003).



**Figure 9 : Activation de la voie JAK-STAT par la liaison de IL-4 et IL-13 sur leur récepteur hétérodimérique.** IL-4 ou IL-13 lie le complexe de récepteur IL-4Rα/IL-13Rα1 et déclenche la phosphorylation de JAK1 et TYK2. Les molécules STAT6 sont ensuite phosphorylées par JAK1 et TYK2, dimérisent et migrent à l'intérieur du noyau. JAK1 = Janus Kinase 1, TYK2 = Tyrosine Kinase 2, STAT6 = Signal Transducer and Activator of Transcription 6, IRS-1/2 = Insulin Receptor Substrate -1/2. P = phosphate

### **3.1.3 Voies de signalisation intracellulaires**

#### **Signalisation : IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$ 1**

Les IL-4 et IL-13 déclenchent et activent la transduction du signal cellulaire principalement par la voie JAK-STAT6. Les sous-unités du récepteur, suite à la liaison de IL-4 ou IL-13, interagissent au niveau de leur région Box-1 avec des JAKs (IL4R $\alpha$  - JAK1, IL13R $\alpha$ 1 - JAK2 ou TYK2) qui sont alors phosphorylées. L'activation des JAK induit la phosphorylation des résidus tyrosines cytoplasmiques. La présence de ces phosphotyrosines conduit au recrutement de STAT6 par le biais de son domaine Src Homology 2 (SH2) sur la chaîne IL-4R $\alpha$ . L'interaction de JAK1 avec STAT6 mène à la phosphorylation de la tyrosine Y641 et à la dimérisation de ce facteur de transcription STAT6. Le dimère STAT6 subit alors une translocation dans le noyau pour réguler des gènes dépendant des IL-4 et IL-13 (Hershey, 2003; Kelly-Welch et al., 2003; Schindler, Levy, & Decker, 2007) (Fig 9).

En ce qui concerne la chaîne IL-13R $\alpha$ 1, il a été rapporté que STAT3 peut être recruté au niveau de ses phosphotyrosines et y être partiellement activé dans les kératinocytes (Chatila, 2004; Hershey, 2003; Wery-Zennaro et al., 1999).

D'autres médiateurs de la signalisation associée au récepteur IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 ont été identifiés. Suite à la stimulation du récepteur par les IL-4 ou IL-13, les protéines IRS-1 ou IRS-2 sont recrutées, phosphorylées et activées au niveau de la phospho-Y497 de la chaîne IL-4R $\alpha$ . Ces protéines peuvent alors permettre l'activation des voies PI3K/Akt (Jiang et al., 2000; Kelly-Welch et al., 2003; Wills-Karp & Finkelman, 2008). IRS-1 et 2 servent également de site d'ancrage aux protéines adaptatrices Grb2, intervenant dans la signalisation de la voie Ras/MAPK (Fig 9). L'existence de cette interaction IRS-1/Grb2 en réponse aux IL-4 ou IL-13 dans les kératinocytes n'est pas, jusqu'à présent, clairement établie dans la littérature.

En plus de l'activation de la cascade JAK-STAT, il a été rapporté que les kinases ERK1/2 et la MAPK p38 sont activées en réponse aux IL-4 ou IL-13 dans des kératinocytes primaires humains et des kératinocytes immortalisés HaCaT (M. D. David et al., 2003; Kelly-Welch et al., 2003; Omori-Miyake, Yamashita, Tsunemi, Kawashima, & Yagi, 2014; Wery, Letourneur, Bertoglio, & Pierre, 1996).

#### **Régulation de la signalisation**

Il existe des mécanismes régulateurs intrinsèques permettant de limiter la signalisation des IL-4 et IL-13 (McCormick & Heller, 2015).

**Les protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling)** sont une famille de régulateurs négatifs de la signalisation des cytokines et plus particulièrement de la voie JAK-STAT. Les SOCS dont l'expression est induite par les cytokines se lient et inhibent directement les JAK ou les ciblent pour la dégradation protéasomale (Hershey, 2003; Kile et al., 2002). L'expression des protéines SOCS-1 et SOCS-3 sont induites par STAT6 activé sous la stimulation des IL-4 et IL-13. Elles exercent alors, à leur tour, des actions sur d'autres composants protéiques associés à des voies de signalisation activées par d'autres cytokines (Albanesi et al., 2007).

**Les phosphatases SHP-1 et SHP-2** font partie de la famille des protéines tyrosine phosphatases (PTP) qui fonctionnent de manière coordonnée avec les protéines tyrosine kinases afin de contrôler les voies de signalisation. SHP-1 induit la déphosphorylation de STAT6 (Kelly-Welch et al., 2003; McCormick & Heller, 2015) alors que SHP-2, en plus de son rôle de régulateur, sert également d'intermédiaire dans la signalisation (Qu, 2000).



### **3.2 Influence des IL-4, IL-13 sur l'épiderme et dans la DA**

Les IL-4 et IL-13, exprimées à des niveaux élevés dans la DA, peuvent modifier certaines réponses des kératinocytes et en conséquence, influencer la production de protéines impliquées dans la différenciation terminale, de AMPs et/ou de lipides de la couche cornée.

En effet, les IL-4 et IL-13, d'une manière STAT6-dépendante, réduisent la cohésion de l'épiderme et altèrent les propriétés de la barrière épidermique. Des études récentes ont démontré que ces cytokines Th2 atténuent l'expression de composants structuraux de l'épiderme tels que les kératines (1 et 10) et les cadhérines desmosomales (Dsg-1 et Dsc-1), entravant la cohésion entre les kératinocytes murins et entre les kératinocytes humains en culture (Omori-Miyake et al., 2014; Tsuchisaka et al., 2014). Les IL-4 et IL-13 réduisent également l'expression de la filaggrine, la loricrine et l'involucrine, protéines critiques pour la formation de la barrière encodées au sein du complexe de différenciation épidermique (B. E. Kim, Leung, Boguniewicz, & Howell, 2008; Pellerin et al., 2013).

D'autre part, les cytokines Th2 incluant les IL-4 et IL-13, induisent des changements dans la composition lipidique à l'intérieur de la couche cornée (Danso et al., 2014; Elias, 2014) résultant en une altération de l'imperméabilité de la barrière et de sa fonctionnalité. Toutes ces dérégulations sont corrélées avec une barrière de la peau défectueuse typique de la DA. Il a donc été suggéré que les cytokines et STAT6 contribuent de façon critique à la pathogenèse de la DA.

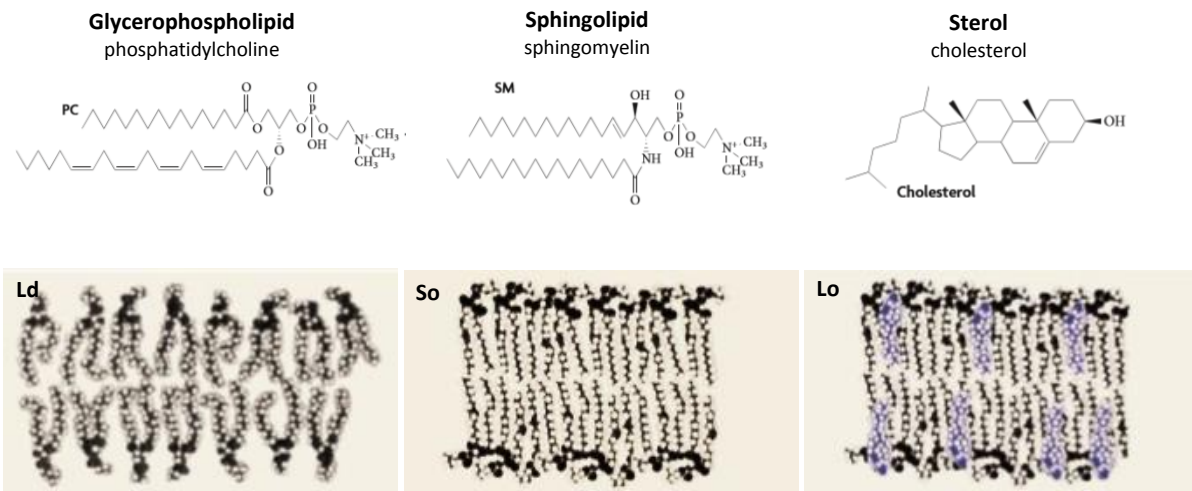
Par ailleurs, les IL-4 et IL-13 induisent, dans des cultures de kératinocytes, l'expression de la «Carbonic Anhydrase II» (CAII) et du « Neural Epidermal growth factor-like 2 » (NELL2), deux protéines marqueurs de la DA où elles sont fortement exprimées (Kamsteeg et al., 2011; Kamsteeg et al., 2007). Ces cytokines Th2 sont également responsables de la diminution de la génération de AMPs (« Human  $\beta$ -defensins » (HBD)-2 et HBD-3) par des kératinocytes (Nomura et al., 2003). Néanmoins les voies de signalisation impliquées dans les réponses des kératinocytes aux IL-4 et IL-13, comme la voie JAK-STAT6 et les voies des MAPKs, sont très peu étudiées.

Il a été rapporté d'une part que la signalisation associée à des cytokines, impliquant les protéines STAT, pourrait être liée à la présence de microdomaines lipidiques (Sehgal, Guo, Shah, Kumar, & Patel, 2002) et, d'autre part, que chez les patients atteints de DA la signalisation associée aux microdomaines lipidiques pourrait être perturbée (Mathay et al., 2011).

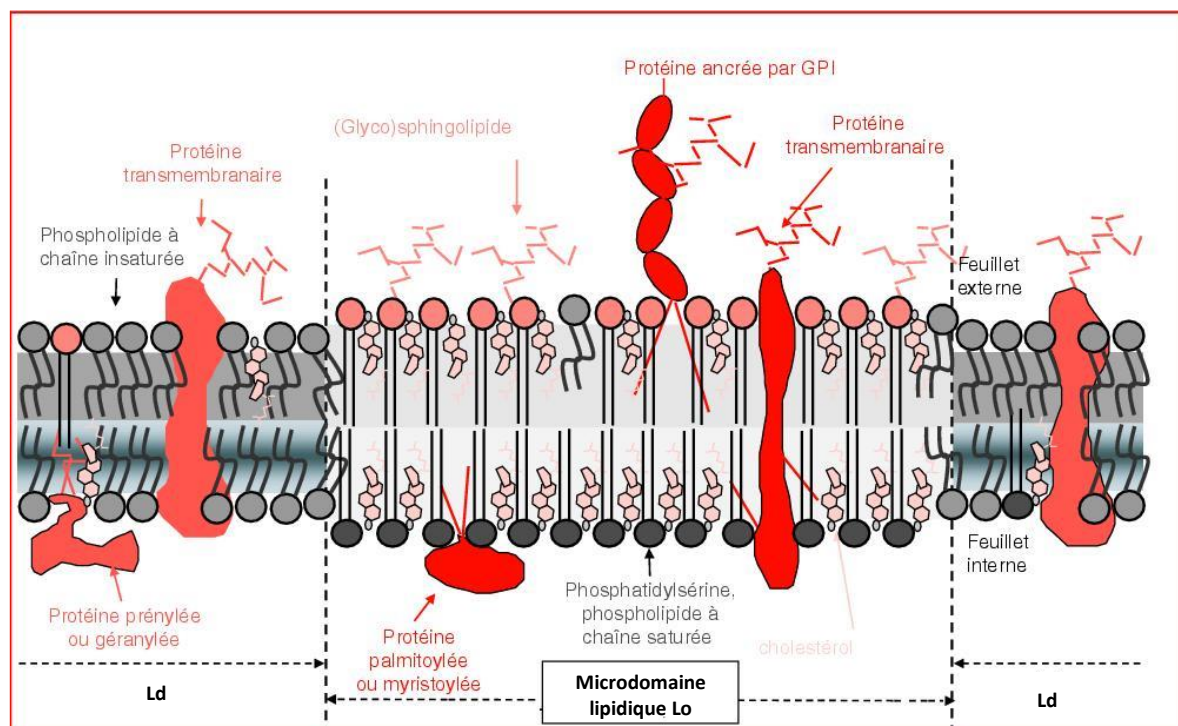
## **4 Les microdomaines lipidiques et transduction du signal**

### **4.1 Composition et organisation dynamique de la membrane plasmique**

La membrane cellulaire est formée principalement de glycérophospholipides qui s'organisent de manière à former une bicouche dans laquelle des protéines de topologie variée (protéines intégrales et périphériques) sont retrouvées. Ces lipides amphipathiques s'orientent de manière à former deux feuillets lipidiques grâce à l'association de leur partie hydrophobe et l'interaction de leurs parties hydrophiles avec l'environnement aqueux. En plus des glycérophospholipides, d'autres lipides structuraux majeurs composant ces membranes biologiques sont les sphingolipides et les stérols. Typiquement, les sphingomyélines (SMs) et le cholestérol enrichissent la membrane cellulaire dans le règne animal. Sur base de combinaisons de ces lipides et de leurs interactions réciproques (Simons & Sampaio, 2011; van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008), la membrane cellulaire apparaît comme un complexe



**Figure 11 : Lipides structuraux et phases lipidiques de la membrane.** La plupart des glycérophospholipides possèdent des chaînes hydrocarbonées insaturées et forment alors des phases liquides désordonnées (Ld). Les sphingomyélines possèdent des chaînes hydrocarbonées longues et saturées et forment alors des phases solides (So). Le cholestérol en s'associant aux lipides membranaires permet la formation de phase fluide ordonnée (Lo). Adapté à partir de Meer et al., 2008.



**Figure 10 : Structure et composition des microdomaines lipidiques.** Les microdomaines lipidiques sont enrichis en sphingomyéline et cholestérol qui leur confèrent une structure ordonnée. Ces domaines membranaires spécialisés contiennent de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal. <http://www.lookfordiagnosis.com>

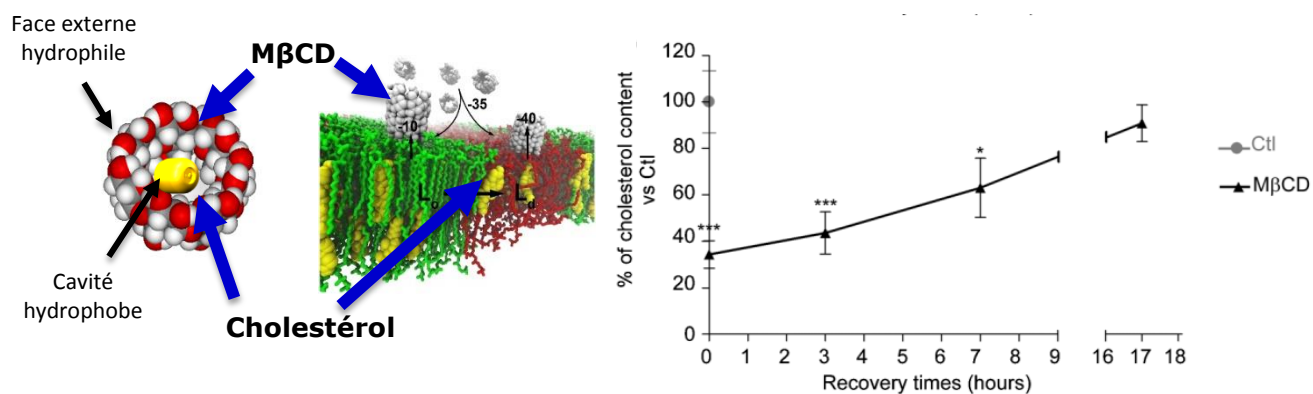
de phases fluides, ordonnées et désordonnées. Le cholestérol, par le biais de son noyau stérol, interagit préférentiellement avec les SMs et les chaînes d'acide gras saturées, et mène à la formation de phases fluides ordonnées (Lo) qui se distinguent alors des phases fluides désordonnées (Ld) enrichies en lipides insaturés (Klymchenko & Kreder, 2014; Simons & Sampaio, 2011). En plus de son rôle dans l'association sélective des lipides (Lingwood & Simons, 2010), la présence du cholestérol inséré entre les chaînes d'acides gras permet d'augmenter la fluidité membranaire (phase fluide). Ainsi, la membrane, tout en conservant sa structure de « gel – solide » conséquente à la présence des SMs, autorise une mobilité latérale élevée de ses composants (van Meer et al., 2008) et influence alors la fonctionnalité membranaire (Fig 10).

En plus de ces interactions lipidiques, les protéines transmembranaires ou ancrées sur une ou l'autre face de la membrane ont une affinité préférentielle pour certains lipides, permettant leur recrutement au sein d'un environnement membranaire et favorisant alors leurs interactions essentielles pour la réalisation d'événements cellulaires importants. Sur base des compositions et interactions lipidique et protéique, des domaines fonctionnels dynamiques se structurent latéralement au sein de la membrane plasmique. Cette organisation préférentielle entre sphingolipides, stérols et protéines spécifiques génère une sous-compartmentalisation de la membrane, organisant sa bioactivité. C'est ainsi que la notion de microdomaines lipidiques a émergé, complétant le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson (1972) (Singer & Nicholson, 1972), selon lequel les protéines membranaires mobiles baignent dans un fluide lipidique neutre (Simons & Toomre, 2000) dont les composants ont été distribués aléatoirement (Engelman, 2005).

#### **4.2 Les microdomaines lipidiques**

Les microdomaines lipidiques se localisent différemment selon le type cellulaire. Ils s'accumulent au niveau de la membrane apicale et en plus petites quantités au niveau des membranes basolatérales des cellules polarisées telles que les kératinocytes épithéliaux. Les microdomaines lipidiques présents au niveau des membranes basolatérales sont plus actifs dans la transduction du signal (Simons & Toomre, 2000). Ils apparaissent, au sein de la membrane plasmique, comme des domaines spécialisés et enrichis sélectivement en cholestérol et sphingolipides qui vont leur conférer une structure ordonnée (Fig 11). En plus de cette composante lipidique, ces domaines, de l'ordre du micron, contiennent des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire dont l'activation nécessite une ré-organisation des récepteurs et de leur signalosome au sein de la membrane (Kabouridis, Janzen, Magee, & Ley, 2000; Pike, 2005; Simons & Toomre, 2000). Des interactions cruciales lipides-protéines et lipides-lipides semblent donc nécessaires pour la transduction du signal à l'intérieur de tels domaines (Simons & Toomre, 2000). En effet, les microdomaines lipidiques se regroupent en des plateformes de signalisation dynamiques plus grandes et plus stables (Lingwood & Simons, 2010) dans lesquelles des protéines membranaires peuvent être incluses ou exclues sélectivement (Gniadecki, Christoffersen, & Wulf, 2002; Simons & Toomre, 2000). L'affinité d'une protéine pour ces microdomaines peut être modulée par des stimuli extra ou intracellulaires ou par des modifications post-traductionnelles ou conformationnelles (oligomérisation) (Simons & Toomre, 2000).

La plupart de ces protéines retrouvées au sein des microdomaines lipidiques sont des protéines à ancre GPI (GlycosylPhosphatidylinositol), localisées au niveau du feuillet externe, des protéines palmitoylées et myristoylées ainsi que des protéines doublement acylées telles que des Src kinases, localisées au niveau du feuillet cytosolique (Simons & Sampaio, 2011; Simons & Toomre, 2000) (Fig 11). En plus de ces protéines associées aux membranes, les microdomaines comptent également des protéines transmembranaires dont des récepteurs à



**Figure 12 : Déplétion du cholestérol dans des kératinocytes humains par la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD).** Adapté à partir de Lopez et al., 2013 (gauche) et Giltair et al., 2011 (droite)

activité tyrosine kinase comme le récepteur de « Epidermal Growth Factor » (EGFR)) ainsi que des récepteurs spécifiques aux interleukines comme IL-2R (Marmor & Julius, 2001; Rao, Logan, Forrest, Roszman, & Goebel, 2004) et IL-7R (Tamarit et al., 2013). En plus de leur implication dans la transduction du signal, les microdomaines peuvent réguler le trafic membranaire et l'organisation du cytosquelette (Simons & Sampaio, 2011).

Par ailleurs et probablement à cause de leur structure hautement ordonnée, des microdomaines lipidiques sont résistants à la désorganisation par des détergents non-ioniques tels que le Triton X-100. Sur base de cette caractéristique, plusieurs microdomaines et leurs protéines associées peuvent être isolés par centrifugation sur gradient de sucrose (Simons & Toomre, 2000; X. Q. Wang & Paller, 2006). Une approche pour visualiser les microdomaines lipidiques, et plus particulièrement ceux enrichis en sphingomyéline (SM), consiste en l'utilisation simultanée de sondes fluorescentes moléculaires (BODIPY-SM), analogues à la SM, et de fragments non-toxiques de la toxine lysénine, fusionnés à une protéine fluorescente mCherry, qui se lie spécifiquement à la SM endogène. La SM étant un marqueur des microdomaines lipidiques, des ensembles de SMs marquées permettent alors de détecter les domaines (Carquin et al., 2014; D'Auria, Van der Smissen, Bruyneel, Courtoy, & Tyteca, 2011) (Mound, en préparation). Quant aux microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol, ils peuvent être visualisés par le biais de la toxine thêta marquée avec un fluorochrome. La déplétion en cholestérol ne permet plus cette visualisation, indiquant l'importance du cholestérol pour l'organisation de ces domaines (Mound, en préparation).

### **4.3 L'importance du cholestérol dans la signalisation des kératinocytes**

Une procédure efficace et communément utilisée pour étudier l'implication des microdomaines lipidiques dans les processus biologiques, repose sur la déplétion du cholestérol par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) (Simons & Toomre, 2000).

**La M $\beta$ CD** est un oligosaccharide cyclique, composée de 7 sous-unités de glucopyranoses avec un nombre variable de groupements méthyles. Elle est incapable de traverser les membranes et extrait sélectivement le cholestérol des membranes plasmiques via sa cavité centrale hydrophobe, menant alors à la perturbation des microdomaines lipidiques (Kabouridis et al., 2000; Lopez, de Vries, & Marrink, 2013) et à un stress cellulaire. La déplétion du cholestérol par la M $\beta$ CD est transitoire et le cholestérol est resynthétisé en quelques heures de récupération au sein des kératinocytes (De Vuyst et al., 2015; Jans, Atanasova, Jadot, & Poumay, 2004) (Fig 12). Cette capacité de récupération résulte de la synthèse endogène du cholestérol par les kératinocytes eux-mêmes (Giltaire, Lambert, & Poumay, 2011; Jans et al., 2004; Lambert, Ameels, Gniadecki, Herin, & Poumay, 2008; Mathay et al., 2011). Cette propriété permet l'étude de l'influence de la régénération des microdomaines lipidiques sur le fonctionnement cellulaire.

Des études précédentes (Poumay & de Rouvroit, 2012), basées sur l'analyse de kératinocytes cultivés en monocouches, ont démontré que cette désorganisation des microdomaines lipidiques induit des changements profonds dans les voies de signalisation.

La déplétion en cholestérol mène à la dimérisation ligand-indépendante et à la phosphorylation de l'EGFR (Lambert et al., 2008; Lambert, Vind-Kezunovic, Karvinen, & Gniadecki, 2006), déclenchant une activation subséquente de ERK1/2. Les cellules montrent également une activation de la MAPK p38 qui, à son tour module l'expression de gènes incluant le facteur de croissance « heparin-binding EGF-like growth factor » (HB-EGF) (Giltaire et al., 2011; Mathay et al., 2008), l'involucrine et la kératine 10 (Jans et al., 2004).

**L'activation et l'internalisation de l'EGFR (ou HER1)** est induite par la déplétion en cholestérol.

L'EGFR est une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase et dont les ligands sont les membres de la famille de l'EGF incluant HB-EGF, un facteur de croissance autocrine des kératinocytes. Sa signalisation est impliquée dans le contrôle de la prolifération, l'adhésion et la différenciation des kératinocytes (Lambert et al., 2006). Elle contribue également aux fonctions immunitaires et au processus inflammatoire. L'activation du récepteur pourrait être impliquée dans le processus d'hyperplasie épidermique dans des maladies inflammatoires chroniques de la peau telles que le psoriasis et la DA (Mascia, Mariani, Girolomoni, & Pastore, 2003; Pastore, Mascia, Mariani, & Girolomoni, 2008).

EGFR est présent au sein des microdomaines lipidiques (Lambert et al., 2008; Pike, 2005) (Mound, en préparation). Cette localisation semble avoir un effet inhibiteur sur l'activation du récepteur par la présence de contraintes stériques (Pike, 2005). La déplétion du cholestérol, en enlevant ces contraintes exercées par les microdomaines sur l'EGFR, permet alors une amélioration de sa liaison à son ligand et de son activité kinase (Pike, 2005). De plus, le traitement à la M $\beta$ CD induit une activation ligand-dépendante et ligand-indépendante de l'EGFR. L'activation ligand-dépendante pourrait être due à la liaison d'HB-EGF dont l'expression et la libération sont induites par la déplétion en cholestérol (Giltaire et al., 2011; Mathay et al., 2008). HB-EGF est exprimé en membrane sous forme d'un précurseur proHB-EGF qui est clivé en HB-EGF sous l'action de métalloprotéases (MMP) telle que MMP3, MMP9, MMP1 et MMP10. Ces dernières sont induites lors d'une perturbation membranaire avec la M $\beta$ CD (S. Kim et al., 2007; Mathay et al., 2011). D'autre part, l'activation ligand-indépendante de l'EGFR a été suggérée par la présence de la phosphorylation et l'internalisation du récepteur après neutralisation de ces domaines de liaison (Lambert et al., 2008; Lambert et al., 2006). Cette internalisation ligand-indépendante induite par la désorganisation des microdomaines lipidiques est dépendante de l'activation de la MAPK p38 et mène à la dégradation du récepteur par le protéasome. La dimérisation et l'autophosphorylation de EGFR permettent l'activation de ERK alors que l'activation de la MAPK p38 ne dépend pas de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (Lambert et al., 2008; Lambert et al., 2006) indiquant alors l'implication d'une voie d'activation supplémentaire dans la modulation du phénotype des kératinocytes après déplétion du cholestérol.

**Une perturbation de la différenciation des kératinocytes** est rapportée suite à la déplétion du cholestérol. L'activation de la MAPK p38 en réponse à la déplétion du cholestérol induit un retard de l'expression des kératines 14 et 10 et une forte induction de l'expression de l'involucrine (Jans et al., 2004). Des membres du complexe de différenciation épidermique, la filaggrine et la filaggrine-2, sont fortement diminués après traitement à la M $\beta$ CD (Mathay et al., 2011).

**Une analyse approfondie du profil transcriptionnel complet** des kératinocytes déplétés du cholestérol par approche *microarray* a révélé, en comparaison au profil transcriptionnel des kératinocytes non-traités, des altérations dans l'expression de multiples gènes codant notamment pour des marqueurs de différenciation, des facteurs de croissance, des médiateurs de l'inflammation, des métalloprotéases et des facteurs de transcription.

Les cibles transcriptionnelles majeures identifiées comme surexprimées comprennent HB-EGF, IL-8, le complexe ligand-récepteur « plasminogen activator urokinase type » PLAU/PLAUR et SOCS3. De manière intéressante, parmi les gènes les plus surexprimés après déplétion du cholestérol, des gènes codant pour des interleukines et récepteurs aux interleukines ont été identifiés avec les IL-8, IL-1B et IL-20 et les récepteurs aux interleukines IL-13R $\alpha$ 2 (+ 306,01 fold change), IL-1RL1 et IL-1R2. Il ressort également de cette analyse

microarray que les gènes codant pour les IL-13R $\alpha$ 1 (+ 5,28 fold change) et IL-4R $\alpha$  (+ 18,77 fold change) sont différenciellement régulés.

Alors que l'involucrine et TGM-1 font partie des gènes dont l'expression est augmentée après déplétion du cholestérol, les cibles transcriptionnelles identifiées comme sous-exprimées après traitement à la M $\beta$ CD comprennent des membres du complexe de différenciation épidermique, la filaggrine, filaggrine-2 et loricrine (Mathay et al., 2011).

**Le traitement des données du microarray par Ingenuity Pathways Analysis IPA** permet de générer, sur base d'études comparatives, des réseaux pertinents expliquant les changements d'expression observés en réponse à la déplétion du cholestérol et d'y associer les voies ou processus pathologiques les plus proches. Il ressort de cette analyse bioinformatique que le profil transcriptionnel des kératinocytes déplétés du cholestérol possède de nombreuses similitudes avec celui des kératinocytes issus de biopsies de peau de patients atteints de DA.

L'expression augmentée de HB-EGF, IL-8, PLAUR, IVL et TGM-1 ont été relevées simultanément avec une expression diminuée de la filaggrine et loricrine dans la peau lésionnelle de DA en comparaison à la peau normale par analyse RT-qPCR. Les changements d'expression de ces gènes, observés dans un contexte de DA, confirment ceux observés après déplétion du cholestérol chez des kératinocytes confluent (Mathay et al., 2011).

Cette recherche propose donc que les kératinocytes cultivés en monocouches, déplétés du cholestérol, possèdent un profil transcriptionnel similaire à celui observé dans les kératinocytes issus de patients affectés par la DA. Ceci suggère que dans les kératinocytes issus de lésions atopiques, la signalisation dépendante des microdomaines lipidiques pourrait être perturbée (Mathay et al., 2011).

## **5 Objectif du mémoire**

À partir de ces données, une recherche actuelle menée par E. De Vuyst dans le cadre de sa thèse a pour but de reproduire les caractéristiques *in vitro* d'une barrière épidermique défectueuse, comme retrouvée dans la peau de DA. Cette étude repose sur la déplétion du cholestérol de kératinocytes dans un épiderme humain reconstruit (RHE) qui est un modèle *in vitro* plus représentatif du contexte épidermique *in vivo* (Frankart et al., 2012). L'activation des kératinocytes par la déplétion du cholestérol de la membrane plasmique après 2h d'incubation en présence de M $\beta$ CD, induit une augmentation de l'expression de TSLP, une cytokine majeure dans la DA libérée par les kératinocytes et impliquée dans la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Th2 (Dhingra et al., 2013; Jariwala et al., 2011). Les RHE, constitués seulement de kératinocytes et donc exempts de cellules immunitaires, sont, après avoir été traités par la M $\beta$ CD, soumis à une stimulation de 48h en présence de cytokines exogènes associées à la réponse Th2 (IL-4, IL-13, IL-25). Ces RHE montrent certaines caractéristiques morphologiques (spongiose) et fonctionnelles (perméabilité augmentée) ainsi que des profils d'expression de gènes (filaggrine, loricrine, CA2, NELL2,...) similaires à ceux retrouvés dans des lésions de la DA. La combinaison des deux traitements semble induire des effets plus prononcés que ceux observés lorsque les épidermes sont uniquement traités avec les interleukines IL-4, IL-13 et IL-25. Ceci suggère que l'activation préalable des kératinocytes par la déplétion du cholestérol les sensibiliserait à l'incubation subséquente avec les interleukines ou que la combinaison de la déplétion du cholestérol et de la stimulation aux interleukines agirait synergiquement sur l'altération de la barrière épidermique (De Vuyst, en préparation).

L'objectif de cette recherche est de comprendre le mécanisme par lequel la combinaison des traitements appliquée sur les RHE améliore les effets observés lors de la seule stimulation avec les interleukines sur l'altération de la barrière épidermique et le profil d'expression de gènes associés à la DA.

L'hypothèse de notre recherche repose sur l'implication potentielle de la régulation des récepteurs aux IL-4 et -13, que ce soit au niveau de leur expression, de leur signalisation subséquente ou de leur localisation, dans l'apparition des effets exacerbés observés dans les épidermes reconstruits, le tout s'inscrivant dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques.

Dans ce cadre, il est intéressant d'étudier les effets de la déplétion du cholestérol membranaire des kératinocytes, suivie ou non de la stimulation par les interleukines, sur cette régulation des récepteurs aux IL-4 et IL-13, constitués de trois protéines différentes IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2. Dans ce but, il convient d'analyser l'expression des récepteurs et leur localisation cellulaire. L'effet synergique pourrait en effet résulter d'une augmentation de l'expression des récepteurs aux IL-4 et IL-13 rendant les kératinocytes plus sensibles et réactifs aux interleukines IL-4 et -13 et/ou résulter d'une relocalisation des récepteurs permettant éventuellement une amélioration de leur activité.

Il convient également d'analyser les voies de signalisation associées aux récepteurs des interleukines IL-4 et -13 et à la déplétion du cholestérol, ainsi que leurs possibles interactions. Cette étude de la signalisation permettrait de déterminer d'une part si une activation du récepteur, indépendante de son ligand, est induite par la perturbation des microdomaines lipidiques et d'autre part, si l'effet potentiellement synergique résulte de l'activation d'une voie commune aux interleukines et à la déplétion du cholestérol ou s'il s'agit de voies différentes.

Notre choix de cibler préférentiellement les récepteurs aux IL-4 et IL-13 s'explique par l'observation d'effets moins importants induits par IL-25 contrairement à ceux associés aux IL-4 et IL-13 dans le modèle RHE développé par E. De Vuyst. De plus, bien que l'implication de IL-25 dans la pathogenèse de la DA est rapportée dans la littérature, les IL-4 et IL-13 sont définies comme étant les médiateurs majeurs de la réponse Th2 montrée surexprimée dans la DA. Enfin, IL-25 étant une cytokine Th17, étudier le récepteur de IL-25 reviendrait à investiguer à la fois les domaines Th2 et Th17, ce qui complexifierait la compréhension des mécanismes.

Dans le but de se donner l'opportunité de mettre en évidence le moindre effet de la déplétion du cholestérol et/ou de la stimulation aux interleukines sur la régulation des récepteurs, l'ensemble de ces analyses seront d'abord effectuées dans des cultures de kératinocytes en monocouches, modèle plus simple que celui des épidermes reconstruits. Les effets observés dans le modèle en monocouches seront ensuite investigués d'une manière plus approfondie dans le modèle en RHE déplété du cholestérol et/ou stimulé par les interleukines.



**Tableau 1 : Solutions et milieux nécessaires à la culture des kératinocytes humains**

**Solution A (pH 7,4)**

---

Composition

- Glucose 10 mM
- KCl 2 mM
- NaCl 130 mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM
- Rouge de phénol 0,0033 mM
- HEPES 30 mM

**Trypsine T17 (pour altération des tissus épidermiques)**

---

Composition

- Solution A
- Trypsine 0,17% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

**Trypsine T25 (pour passage)**

---

Composition

- Solution A
- Trypsine 0,025% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- EDTA 0,01% (Éthylène Diamine TétraAcétate ; Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

**Solution bloquante**

---

Composition

- Solution A
- dFCS 2% (dialyzed fetal calf serum ; Clonetics, Verviers, Belgique)

**KGM-2® (Keratinocyte Growth Medium)**

---

Composition

- KBM-2® (Keratinocyte Basal Medium ; Lonza, Verviers, Belgique ) (Calcium 0,15 mM)
- Suppléments (Clonetics, Verviers, Belgique) :
  - BPE (Bovine Pituitary Extracts) 50 µg/ml
  - hEGF 10 ng/ml
  - Hydrocortisone  $5 \cdot 10^{-7}$  M
  - Insuline 5 µg/ml
  - Transferrine 5 µg/ml
- Antibiotiques :
  - Fungizone 250 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
  - Gentamycine 50 µg/ml (BioWhittaker-Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
  - Ampicilline 250 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

## **1 Culture cellulaire** [Tableau 1]

### **1.1 Culture primaire**

Les échantillons de peau humaine sont issus d'abdominoplasties de patients sains et consentants réalisées par le Docteur Bienfait (Clinique Saint Luc, Bouge, Namur). Les prélèvements de peau sont sectionnés à l'aide d'un dermatome, permettant ainsi de récupérer la partie supérieure du tissu, correspondant à l'épiderme et une partie du derme. Les échantillons sont ensuite conservés dans de la solution physiologique à 4°C. Les kératinocytes isolés des échantillons d'un patient sont répertoriés comme nouvelle souche de «Normal Abdominoplasty Keratinocytes» (NAK).

Les échantillons de peau, étalés dans de la solution A dans des boîtes de pétri (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), sont découpés en carrés d'1 à 2 cm<sup>2</sup>. Ces fragments sont ensuite déposés, de sorte que le derme soit immergé, dans une solution de trypsine T17 supplémentée de gentamycine (50 µg/ml), ampicilline (0,25 µg/ml) et fungizone (0,25 µg/ml) durant une nuit à 4°C. Cette incubation, par l'action de la trypsine, permet de séparer l'épiderme du derme à l'aide de pinces. Les fragments d'épiderme sont alors placés dans du milieu de culture KGM-2® contenant 2% de sérum de veau fœtal dialysé (dFCS ; Clonetics, Verviers, Belgique), ce dernier permettant de neutraliser l'activité de la trypsine. Le lendemain, dans ce milieu de culture, les cellules épidermiques sont dissociées mécaniquement à l'aide de pinces et la suspension cellulaire obtenue est passée à travers un filtre de 70 µm (Cell Strainer ; Greiner Bio-one, Kremsmünster, Autriche) afin d'éliminer les amas cellulaires. Le filtrat est ensuite centrifugé à 1000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes et le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 10 ml de milieu de culture KGM-2®. Les cellules sont ensuiteensemencées à une densité cellulaire d'environ 46 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des flasques de culture de 175 cm<sup>2</sup> (T175 ; Cellstar, Frieckenhausen, Allemagne) contenant 25 ml de KGM-2® additionné de 0,1% de dFCS favorable à la prolifération cellulaire. Ce milieu est particulièrement favorable à l'adhésion cellulaire compte tenu de sa teneur en calcium légèrement plus élevée que celle du milieu de culture « classique », Epilife®, utilisé plus spécifiquement pour la croissance cellulaire. Les boîtes de culture sont ensuite placées à l'incubateur à 37°C dans une atmosphère humide contenant du CO<sub>2</sub> à 5%. Au terme de 3 jours d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu de culture Epilife® complet présentant une concentration en calcium inférieure à celle du milieu KGM-2®. Ce milieu correspond au milieu de base Epilife® suppléé en HKGS ainsi qu'en agents antibiotiques et antifongique (gentamycine, ampicilline et fungizone). Ce milieu est renouvelé tous les 2 jours jusqu'à ce que les kératinocytes couvrent approximativement 50-60% de la surface de culture.

### **1.2 Culture secondaire**

Le passage des kératinocytes en culture secondaire permet de les amplifier. Lorsque les cellules de la culture primaire atteignent 50% à 60% de confluence (phase de prolifération importante), elles sont détachées de la boîte de culture à l'aide d'une solution de trypsine T25. Cette étape de trypsinisation consiste à incuber les kératinocytes pendant 5 minutes dans 8 ml de trypsine qui est ensuite aspirée de sorte à en laisser environ 1 ml. Cette première phase de trypsinisation permet d'enlever les types cellulaires contaminants tels que fibroblastes et mélanocytes. Elle se prolonge ensuite d'une dizaine de minutes pour détacher la totalité des cellules restantes. Au terme de cette période d'incubation, les kératinocytes sont collectés dans 10 ml de solution bloquante froide pour inhiber l'action de la trypsine. Les suspensions cellulaires sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm, à 4°C et le culot est ensuite resuspendu dans du milieu complet Epilife® froid. Les cellules sont comptées et

### **Milieu complet Epilife®**

---

#### **Composition**

- Epilife® (Cascade Biologics, Oregon, USA) (Calcium 0,06 mM)
- HKGS (Human Keratinocyte Growth supplement; Cascade Biologics, Oregon, USA) :
  - BPE (Bovine Pituitary Extracts) 0,2 %
  - hEGF 0,2 ng/ml
  - Hydrocortisone 0,18 µg/ml
  - Insuline 5 µg/ml
  - Transferrine 5 µg/ml
- Antibiotiques
  - Pénicilline G 50 U/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
  - Streptomycine 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

### **Milieu de congélation**

---

#### **Composition**

- Milieu Epilife® complet (Cascade Biologics, Oregon, USA)
- DMSO (Diméthylsulfoxyde) 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- dFCS 20 % (Clonetics, Verviers, Belgique)

### **Milieu Epilife® de croissance autocrine**

---

#### **Composition**

- Epilife® (Cascade Biologics, Oregon, USA) (Calcium 0,06 mM)
- Pénicilline G 50 U/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- Streptomycine 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- Acides aminés (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) :
  - L-histidine 0,24 mM
  - L-isoleucine 0,75 mM
  - L-méthionine 0,9 mM
  - L-phenylalanine 0,9 mM
  - L-tryptophan 0,45 mM

ensemencées à une densité de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des flasques T175. Le milieu est remplacé tous les 2 jours.

### **1.3 Cryopréservation des kératinocytes**

Les cultures secondaires sont amenées à atteindre approximativement 70% de confluence, état de sous-confluence favorable à l'obtention d'un grand nombre de cellules prolifératives et non engagées dans la différenciation cellulaire. Les kératinocytes sont détachés (T25), centrifugés et resuspendus (comme indiqués lors de la réalisation des cultures secondaires) à raison de 2 millions de cellules par ml dans du milieu de culture complet Epilife®. Un volume équivalent de milieu de congélation est ensuite ajouté afin d'obtenir une densité cellulaire de 1 million de cellules par ml. Cette suspension cellulaire est distribuée dans des cryotubes de 1,5 ml (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Les tubes sont placés à -80°C pendant une nuit avant d'être stockés dans de l'azote liquide à -180°C.

### **1.4 Culture tertiaire**

Dans le cadre des expériences réalisées, des cultures tertiaires de kératinocytes prolifératifs sont utilisées pour les cultures en monocouche et la reconstruction de tissus épidermiques. Les suspensions cellulaires cryopréservées (2.10<sup>6</sup> cellules) sont décongelées dans un bain marie à 37°C et ensemencées dans une T175 dans 25 ml de milieu de culture KGM-2®, favorable à l'adhérence cellulaire. Après 24 h, ce milieu est remplacé par 25 ml de milieu Epilife® complet afin d'éliminer les traces de DMSO toxique, présent dans le milieu de congélation, et de permettre une croissance optimale des kératinocytes. Le milieu complet Epilife® est renouvelé tous les 2 jours. Lorsque les kératinocytes prolifératifs couvrent approximativement 70% à 80% de la surface de la flasque de culture (environ 3 jours), les cellules sont trypsinisées (T25) et collectées dans une solution bloquante froide comme indiqué dans la partie culture secondaire. Les suspensions cellulaires sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm à 4°C. Une fois le culot cellulaire resuspendu dans 2 ml de milieu complet Epilife® à 4°C, les cellules sont comptées et ensemencées à une densité cellulaire déterminée selon le type de culture et d'expérience.

#### **Culture en monocouche :**

Pour les cultures en monocouche, les kératinocytes sont ensemencés à raison de 5500 ou 8500 cellules/cm<sup>2</sup> selon le type d'expérience réalisée. Le milieu de culture (Epilife complet ®) est changé tous les 2 jours jusqu'à ce que les kératinocytes atteignent une densité telle que 60 à 70% de la surface de culture soit recouverte. À partir de ce stade de confluence, les cellules sont placées en condition de culture autocrine consistant à cultiver les kératinocytes dans du milieu Epilife® de croissance autocrine, milieu Epilife® complet privé de facteurs de croissance exogènes et supplémenté en acides aminés et en antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Les kératinocytes sont capables de produire leurs propres facteurs de croissance, leur permettant ainsi de continuer à croître et de proliférer de façon autocrine (Minner, Herphelin, & Poumay, 2010). L'hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), utilisée à une concentration de 5.10<sup>-7</sup> M, habituellement ajoutée au milieu de culture autocrine, est soustraite du milieu afin d'éviter toute possible interaction avec les réactions inflammatoires. Le milieu de culture est remplacé tous les 2 jours jusqu'à atteindre le stade de confluence, stade auquel les cellules sont exploitées.

La morphologie cellulaire est analysée par microscopie à contraste de phase (Olympus CKX41).

### Milieu Epilife® pour la culture de RHE (Ensemencement Jour 0)

#### Composition

- Milieu complet Epilife®
- $\text{CaCl}_2$  1,44 mM (R&D Systems, Abingdon, UK)

### Milieu Epilife® pour la mise en culture de RHE (Jour 1 – Jour 9)

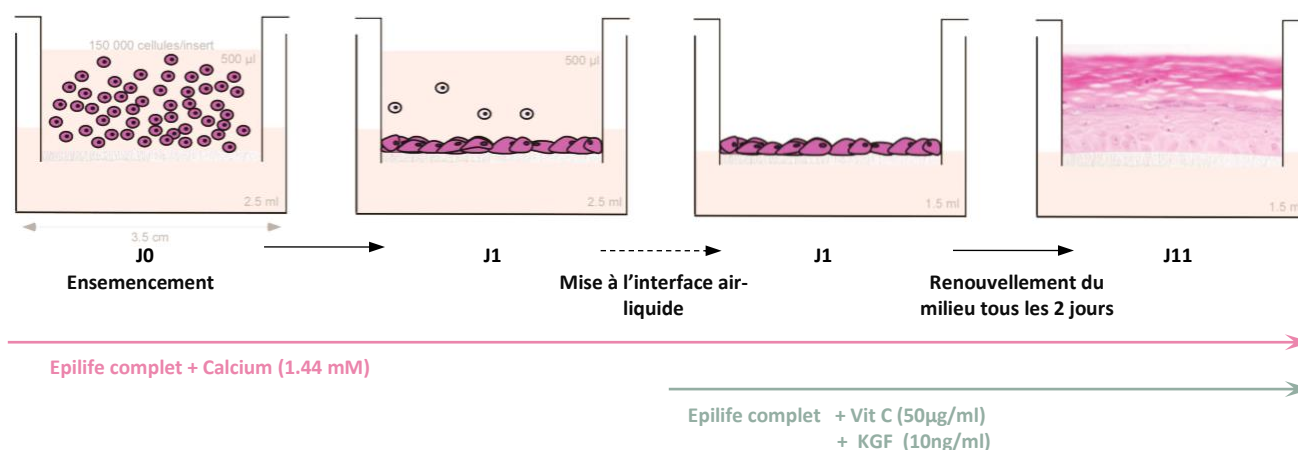
#### Composition

- Milieu complet Epilife®
- $\text{CaCl}_2$  1,44 mM (R&D Systems, Abingdon, UK)
- KGF 10 ng/ml (R&D Systems, Abingdon, UK)
- Vitamine C 50 µg/ml (R&D Systems, Abingdon, UK)

### Milieu Epilife® pour la culture de RHE (Jour 9 – Jour 11)

#### Composition

- Milieu Epilife® avec HKGS et sans hydrocortisone
- $\text{CaCl}_2$  1,44 mM (R&D Systems, Abingdon, UK)
- KGF 10 ng/ml (keratinocyte growth factor; R&D Systems, Abingdon, UK)
- Vitamine C 50 µg/ml (R&D Systems, Abingdon, UK)



### Schématisation de la mise en culture d'épiderme reconstruit

### **Mise en culture d'épiderme humain reconstruit (RHE) :**

Lorsque les kératinocytes couvrent environ 70-80% de la surface de la flasque T175, les cellules sont détachées. Il est nécessaire que les kératinocytes atteignent ce stade de confluence pour la mise en culture d'épidermes reconstruits afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules tout en ayant des capacités prolifératives optimales. Au-delà de cette densité cellulaire, les cellules entament leur processus de différenciation, devenant alors moins prolifératives.

Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu à une densité cellulaire de 380 000 cellules/ml dans du milieu Epilife® complet supplémenté en  $\text{CaCl}_2$  (+ 1,44 mM) pour atteindre une concentration de 1,5 mM (une concentration élevée en calcium permet la formation des jonctions intercellulaires et la stratification des cellules). 500  $\mu\text{l}$  de cette suspension cellulaire sont déposés dans un insert en polycarbonate (Millipore, Massachusetts, USA), sur un filtre (0,63  $\text{cm}^2$ ) percé de pores de 0,4  $\mu\text{m}$  de diamètre et servant de support d'adhésion aux cellules. Les inserts sont préalablement placés dans une plaque de culture 6 puits (Cellstar, Frieckenhausen, Allemagne), contenant 2,5 ml de milieu Epilife® complet enrichi en calcium (1,5 mM). Après 24 h, les cellules sont mises à l'interface air-liquide par aspiration du milieu présent dans la cupule. Cette exposition des kératinocytes à l'air permet d'obtenir une couche cornée et une barrière épidermique fonctionnelle (Frankart et al., 2012). Le milieu des puits est également remplacé par 1,5 ml de milieu Epilife® complet contenant 1,5 mM de calcium, du KGF et de la vitamine C. Cette dernière étant photosensible, il convient dès lors de travailler dans l'obscurité. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour de croissance à partir de l'interface air-liquide, l'épiderme reconstruit correspondant alors à la formation d'un tissu épidermique complètement différencié et fonctionnel, semblable au tissu in vivo. Au 9<sup>ème</sup> jour de reconstruction, le milieu de culture est exempté d'hydrocortisone afin d'éviter tout effet anti-inflammatoire possible de ce composé.

## **2 Différents stress cellulaires et traitements des kératinocytes**

### **2.1 Déplétion du cholestérol membranaire**

#### **Culture en monocouche :**

Les cultures cellulaires confluentes sont traitées avec la méthyl-beta-cyclodextrine (M $\beta$ CD; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) afin de diminuer la concentration en cholestérol membranaire et de perturber les microdomaines lipidiques membranaires. Ce traitement consiste à incuber pendant 2h les cellules en présence de la solution de M $\beta$ CD utilisée à une concentration de 7,5 mM, correspondant approximativement à 1% (masse/volume). Cette concentration a été classiquement utilisée pour traiter les kératinocytes en culture (De Vuyst et al., 2015; Giltaire et al., 2011; Jans et al., 2004; Lambert et al., 2008; Lambert et al., 2006; Mathay et al., 2008; Mathay et al., 2011). La M $\beta$ CD est préalablement dissoute dans du milieu de culture autocrine Epilife® par agitation pendant 30 minutes. Cette solution est ensuite stérilisée par filtration à travers un filtre 0,2  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore, Bruxelles, Belgique) et chauffée à 37°C. Après aspiration du milieu de culture, 1,5 ml de la solution est appliqué sur les cellules confluentes. Au terme de 2 heures d'incubation, les cellules traitées récupèrent ou non (0 h) dans du milieu de culture autocrine Epilife® pendant différentes périodes de temps. Les cellules sont, selon le type d'expérience, directement exploitées ou conservées à -80°C après aspiration complète du milieu de culture. Pour les cellules « contrôles négatifs » (non incubées en présence de M $\beta$ CD), leur milieu est remplacé, au timing correspondant à celui des cellules traitées, par du milieu Epilife® de croissance autocrine.

### **Culture d'épiderme humain reconstruit :**

Les tissus obtenus suite à 11 jours de croissance sont traités selon le même procédé que pour les cultures en monocouche. La seule différence réside dans le milieu de culture utilisé qui est le milieu Epilife® pour la culture de RHE (J9 – J11) exempté d'hydrocortisone et enrichi en 1,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 50 µg/ml de vitamine C et 10 ng/ml de KGF. La MβCD est diluée dans le milieu et déposée à l'extérieur de l'insert. La solution contenant le traitement est alors directement en contact avec les cellules de la couche basale.

## **2.2 Stimulation aux interleukines**

### **Culture en monocouche :**

Les kératinocytes en monocouche sont incubés en présence des interleukines (IL)-4, IL-13 et IL-25 (PeproTech, New Jersey, USA) seules ou combinées pendant différentes périodes, définies selon le type d'expérience. Ces interleukines sont utilisées aux concentrations respectives de 50 ng/ml, 50 ng/ml et 20 ng/ml et diluées dans le milieu autocrine Epilife®. La solution est stérilisée par filtration à travers un filtre 0,2 µm (Millex GP, Millipore, Bruxelles, Belgique) et placée à 37°C avant d'être ajoutée à raison de 1,5 ml sur les monocouches. Les cellules sont préalablement traitées ou non en présence de MβCD durant 2 h.

### **Culture d'épiderme humain reconstruit :**

La stimulation des épidermes reconstruits aux interleukines suit le même procédé que celui utilisé pour le modèle en monocouche mais dans du milieu Epilife® pour la culture de RHE (J9 – J11).

## **2.3 Traitement avec des inhibiteurs ou anticorps neutralisants**

Les tissus obtenus au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont incubés, conjointement aux traitements précédents, durant 48 h en présence de PD 98059 (2 µM – 513000 ; Calbiochem - Merck Millipore, Massachusetts, USA) afin d'inhiber sélectivement l'activation des MAPK ERK1/2.

## **3 Test de viabilité cellulaire (test MTT)**

L'évaluation de la viabilité cellulaire est basée sur la capacité des enzymes mitochondriales à réduire un sel de tétrazolium jaune, le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), en un composé mauve, le formazan. La poudre jaune MTT est dissoute dans du milieu de culture autocrine préalablement chauffé afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 mg/ml. Ce test colorimétrique est réalisé directement à la fin du traitement (MβCD ou stimulation aux interleukines) ou après les différentes périodes de récupération. Le milieu de culture est remplacé par la solution MTT préalablement préparée et les cellules sont incubées durant 1 heure, à l'obscurité et à 37°C. La solution MTT est éliminée et 1,5 ml de propan-2-ol (isopropanol ; Merck, Darmstadt, Allemagne) sont ajoutés aux cellules pendant 5 minutes, à température ambiante (RT) et sous agitation faible. L'isopropanol permet de lyser les cellules et de solubiliser les précipités de formazan. L'estimation de la quantité de formazan dissout est réalisée par dosage de la densité optique à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (VersaMax de Molecular Devices, Berkshire, Royaume Uni). L'absorbance est considérée comme étant proportionnelle au nombre relatif de cellules métaboliquement actives et viables et ainsi témoigne de la cytotoxicité potentielle du traitement. La viabilité des cellules non traitées et n'ayant pas récupérées est arbitrairement considérée comme étant de 100%.

## **4 Étude de la localisation des récepteurs au sein de l'épiderme**

### **4.1 Inclusion en paraffine**

Les tissus épidermiques sont fixés dans du formol acétique (formaline 4% et acide acétique glacial 1%) ou de l'éthanol-formol acétique (formaline 4%, éthanol 70% et acide acétique glacial 5%) pendant minimum 24 h. Ils sont ensuite déshydratés par immersion dans des bains successifs de méthanol (100%). Cette étape de déshydratation est suivie de l'incubation durant 1 h des tissus dans du toluol, solvant de la paraffine. Ce passage en phase organique est essentiel pour permettre l'inclusion des tissus dans la paraffine, celle-ci n'étant pas miscible avec l'alcool. Pour les RHE, ils sont soumis à un premier passage rapide dans le toluol. Celui-ci ayant la capacité de dissoudre le plastique de l'insert, il permet la libération spontanée du filtre de polycarbonate supportant le RHE. Les tissus sont ensuite imprégnés par la paraffine durant 1 h à 60°C avant de passer à l'étape d'enrobage. Cette dernière consiste à positionner correctement le tissu dans un moule rempli de paraffine liquide. La paraffine est ensuite refroidie sur une plaque réfrigérante de l'histocentre (HistoStar ; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) jusqu'à l'obtention d'un bloc suffisamment dur que pour être coupé au microtome. Celui-ci est coupé en sections de 6 µm d'épaisseur (coupons) à l'aide du microtome Leica RM2245 (Wetzlar, Allemagne). Les coupons sont étalés sur des lames Super Frost Plus (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

### **4.2 Coupes à congélation**

Le filtre en polycarbonate sur lequel est ancré le RHE est découpé délicatement à l'aide d'un scalpel et placé ensuite dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound ; Tissue-Tek, Sakura Finetek, Californie, USA) selon une orientation appropriée. Les échantillons épidermiques sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à être découpés à l'aide du cryostat Leica CM 1900 (Wetzlar, Allemagne).

### **4.3 Coloration Hémalun Erythrosine Safran (HES)**

Préalablement, les coupes tissulaires sont déparaffinées, réhydratées et blanchies par immersion dans des bains successifs respectivement de toluol (2 x 2,5 minutes), de méthanol à 100% (2 x 2,5 minutes) et à 70% (1 x 2,5 minutes) et d'eau de ville (3 x 2,5 minutes). Une coloration topographique est ensuite réalisée afin d'analyser la morphologie tissulaire. Ainsi, un trichrome utilisant l'hémalun, l'érythrosine et le safran met respectivement en évidence les acides nucléiques du noyau, les protéines cytoplasmiques et le tissu conjonctif est réalisée pour les tissus épidermiques *in vivo*. Concernant les RHE, seule une coloration bichromique hémalun-érythrosine est effectuée étant donné l'absence de tissu conjonctif pour ces échantillons (station de déparaffinage et de coloration ; Medizintechnik, Burgdorf, Allemagne). Les colorations HES et HE sont des colorations régressives, le principe de celles-ci étant d'appliquer une surcoloration suivie d'une décoloration progressive par élimination de l'excès de colorant à l'aide de différenciateurs (solvants du colorant).

D'un point de vue pratique, les lames réhydratées sont immergées dans une série de bains successifs d'hémalun (1 L de solution saturée d'Alun de potassium, 3 g d'hématéine standard (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) et 20 ml d'acide acétique), d'eau de ville, d'éthanol-HCl (0,4 %), d'eau de ville, d'érythrosine (1 L d'eau de ville, 2 g d'érythrosine (Merck, Darmstadt, Allemagne) et 10 gouttes de formol 35 %), d'eau de ville, d'éthanol (70 %), d'isopropanol (100 %), de safran, d'isopropanol (100 %) et de toluol. Les bains dans le safran sont passés dans le cas du bichrome HE.



## **Tableau 2 : Solutions pour immunomarquage sur tissus**

### **PBS 1x (Phosphate Buffer Saline)**

---

#### Composition

- KCL 2,7 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- NaCl 140 mM (VWR International, Pennsylvanie, USA)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8.1 mM (Vel, Texas, USA)
- pH 7,2

### **Glycine**

---

#### Composition

- Glycine 0,1 M (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

### **PBS - BSA 0,2% - Triton X-100 0,02%**

---

#### Composition

- PBS 1x
- BSA (Bovine Serum Albumine ; PAA laboratories, GmbH, PAsching, Austria)
- Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Les coupes sont ensuite montées au DPX (VWR International, Pennsylvanie, USA) et observées en lumière blanche avec le microscope Olympus BX63. Les photos sont prises avec le logiciel Olympus Cellsens Dimension.

#### **4.4 Marquage immunofluorescent sur tissus** [Tableau 2]

Ce type de marquage est effectué afin de mettre en évidence l'expression d'une protéine et d'établir sa localisation dans les couches de l'épiderme in vitro en conditions traitées ou non et in vivo. Le principe de cette technique est basé sur la reconnaissance de la protéine d'intérêt par un anticorps primaire spécifique d'une espèce, lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un système de visualisation/porteur d'un fluorochrome. La reconnaissance anticorps primaire-secondaire est établie sur base de la reconnaissance de l'espèce différente dans lequel l'anticorps primaire est produit. Il s'agit d'immunofluorescence indirecte.

Les lames sont déparaffinées, réhydratées et blanchies puis rincées dans du PBS avant d'être incubées à 2 reprises pendant 3 minutes dans une solution de glycine 0,1 M. La glycine permet d'éliminer les aldéhydes encore fonctionnelles sur les tissus et ainsi diminuer les liaisons aspécifiques de l'anticorps. Après une étape de rinçage, les lames sont incubées pendant 1 h dans une solution de PBS - BSA 0,2% - Triton X-100 0,02% (solution de saturation) afin de saturer les sites non spécifiques des tissus et de réduire le marquage aspécifique/les liaisons aspécifiques de l'anticorps. Ensuite l'anticorps primaire est dilué dans la solution de saturation et 50 µl sont déposés sur les prélèvements entourés d'un trait de Dakopen, procurant une barrière hydrophobe, afin de limiter la zone de dépôt de l'anticorps et d'obtenir un marquage plus uniforme. Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire adéquat (IL-4R $\alpha$ ) [Tableau 4] toute une nuit/overnight dans une chambre humide et à 4°C. Les lames sont rincées 3 fois dans la solution de saturation et ensuite incubées avec l'anticorps secondaire dilué (reconnaissant les IgG de souris) couplé à Alexa FluorR 488 [Tableau 4] pendant 1 h à température ambiante. Des rinçages sont réalisés avant d'ajouter le Hoechst (2 µg/ml ; Molecular Probes, New York, USA) pendant 15 minutes à température ambiante pour marquer les noyaux. Les incubations avec l'anticorps secondaire et le Hoechst doivent se réaliser à l'abri de la lumière afin de ne pas dégrader leurs fluorochromes. Les lames rincées dans du PBS sont montées au Mowiol (Sigma, Bornem, Belgique) chauffé à 56°C et conservées à 4°C dans l'obscurité. Les tissus sont observés au microscope à épifluorescence Olympus BX63 en gardant les paramètres uniformes (temps d'exposition, objectifs). Les photos sont prises à l'aide du logiciel Olympus Cellsens Dimension.

Des immunomarquages sur des coupes à congélation ont également été réalisés selon la même procédure que décrite précédemment, à l'exception d'une étape simultanée de fixation et de perméabilisation pendant 5 minutes à -20°C dans un mélange de méthanol et d'acétone ainsi que l'utilisation de PBS – BSA 0,2% à la place du PBS - BSA 0,2% - Triton X-100 0,02%.

## **5 Étude de la localisation des récepteurs au sein de la cellule et des microdomaines lipidiques**

### **5.1 Marquage immunofluorescent sur lamelles** [Tableau 3]

Les kératinocytes sont ensemencés à une densité cellulaire de 5500 cellules/cm<sup>2</sup> sur des lamelles couvre-objets dans une plaque 12 puits. Les cellules sont cultivées dans des conditions autocrines et traitées avec la M $\beta$ CD, IL-4 ou IL-13. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du tampon PBS à 37°C puis fixées pendant 15 minutes à température

**Tableau 3 : Solutions pour immunomarquage sur cellules****PBS 1x (Phosphate Buffer Saline)****Composition**

- KCL 2,7 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- NaCl 140 mM (VWR International, Pennsylvanie, USA)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8.1 mM (Vel, Texas, USA)
- pH 7,2

**PBS - Triton X-100 0,1%****Composition**

- PBS 1x
- Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

**PBS - BSA 1% - Triton X-100 0,1%****Composition**

- PBS 1x
- BSA (Bovine Serum Albumine ; PAA laboratories, GmbH, PAsching, Austria)
- Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

**Tableau 4 : Anticorps pour les immunomarquages**

Anticorps	Firme et référence	Isotype	Source	Dilution
STAT6	Cell Signaling Technology (#9362)	Polyclonal	Lapin	1:200
pSTAT6 (Tyr641)	Cell Signaling Technology (#9361)	Polyclonal	Lapin	1:100
IL-4R $\alpha$	R&D Systems (mAb 230)	Monoclonal	Souris	1:50
EEA1	Cell Signaling Technology (#2411)	Polyclonal	Lapin	1:100
Anti-IgG de souris couplé à une sonde Alexa Fluor 488	Life Technologies - Invitrogen (A11001)	Polyclonal	Chèvre	1:1000
Anti-IgG de lapin couplé à une sonde Alexa Fluor 568	Life Technologies - Molecular Probes (A11008)	Polyclonal	Chèvre	1:1000

ambiante avec une solution de paraformaldéhyde (PFA ; Merck, Darmstadt, Allemagne) à 4% et pH 7,2. Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS avant d'être perméabilisées avec du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) pendant 5 minutes à température ambiante pour IL-4R $\alpha$  ou avec du méthanol 100% pendant 10 minutes à -20°C pour P-STAT6 et STAT6. Une étape de saturation est ensuite réalisée. Celle-ci consiste à incuber les cellules pendant 1 h à température ambiante dans du PBS-Triton X-100 contenant 1% de BSA (solution de saturation). Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de saturation et appliqués à raison de 30  $\mu$ l par lamelle (1 goutte) dans une chambre humide overnight et à 4°C.

Pour le double marquage EEA1 et IL-4R $\alpha$ , les deux anticorps primaires sont mélangés et appliqués comme indiqué. Les lamelles couvre-objets sont ensuite remplacées dans les puits de la plaque 12 puits de sorte à ce que la face avec les cellules se trouvent vers l'extérieur. Après 3 rinçages avec du PBS-BSA (1%)-Triton X-100 (0,1%), les cellules sont incubées avec 30  $\mu$ l de l'anticorps secondaire (Life Technologies, New York, USA) approprié dilué dans la solution de saturation pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Les anticorps secondaires sont dirigés contre les IgG de souris ou de lapin et sont couplés à une sonde Alexa FluorR 488 (vert) ou 568 (rouge). Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS-BSA (1%)-Triton X-100 (0,1%). Les noyaux sont ensuite marqués en présence de Hoechst 33258 (Molecular Probes, New York, USA) dilué (0,2 mg/ml) dans la solution de saturation pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont rincées avant d'être montées sur des lames porte-objets à l'aide de Mowiol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) chauffé à 56°C. Les lames sont conservées à 4°C, à l'abri de la lumière. Tous les anticorps nécessaires à l'immunomarquage sont repris dans le [Tableau 4]

Les coupes sont analysées avec un microscope à épifluorescence Olympus BX63 et un objectif 60x en utilisant les mêmes temps d'expositions. Les photos sont prises et analysées à l'aide du logiciel Olympus Cellsens Dimension. Pour les doubles marquages, les observations sont réalisées avec un microscope confocal TCS Leica et un objectif 63x tout en gardant la même valeur de photomultiplication.

Les contrôles négatifs correspondent à l'absence de l'anticorps primaire, remplacé alors par du PBS-BSA (1%)-Triton X-100 (0,1%). Ils permettent de vérifier l'aspécificité éventuelle de l'anticorps secondaire. Pour l'analyse de P-STAT6, un contrôle positif est réalisé via la stimulation des kératinocytes avec IL-4 (100 ng/ml) pendant 30 minutes.

## **5.2 Marquage des microdomaines lipidiques avec des sondes fluorescentes**

La visualisation des microdomaines lipidiques est permise par le marquage des sphingomyélines endogènes, composant majeur avec le cholestérol des microdomaines lipidiques. Ce marquage est réalisé grâce à la liaison spécifique de sondes formées par le fragment non-toxique de la lysénine du ver *Eisenia foetida* fusionnée à la mCherry, une protéine monomérique fluorescente rouge. Cette sonde est fournie par le Dr. Donatienne Tyteca (Unité Cellulaire, Institut De Duve - Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique).

Les kératinocytes sontensemencés à 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des lamelles en verre fixées dans des chambres de culture Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), utilisées spécifiquement pour la visualisation en microscopie confocale en raison de leur surface en verre non fluorescent (des lamelles). Les kératinocytes sont mis en culture dans du milieu complet Epilife® durant 48 h. Avant chaque expérience, la sonde lysénine est mélangée avec du milieu complet Epilife® supplémenté en quantité équimolaire en BSA dépourvue d'acides

**Tableau 5 : Tampon de lyse (extraction protéique)****Tampon de lyse**

Réducteur	Non réducteur (RIPA)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8</li> <li>- SDS 2 %</li> <li>- Glycérol 8,7 %</li> <li>- DTT 0,2 % (dithiotréitol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HEPES 50 mM</li> <li>- NaCl 150 mM</li> <li>- Igepal 0,2 %</li> </ul>

**Tableau 6 : Tampon Laemmli (préparation des échantillons)****Tampon Laemmli**

Réducteur	Non réducteur
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8</li> <li>- SDS 2 %</li> <li>- Glycérol 8,7 %</li> <li>- Bleu de bromophenol 0,05 %</li> <li>- DTT 0,2 % (dithiotréitol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8</li> <li>- SDS 2 %</li> <li>- Glycérol 8,7 %</li> <li>- Bleu de bromophenol 0,05 %</li> </ul>

**Tableau 7 : Solutions pour l'électrophorèse et le transfert en Western blot****Gel d'empilement (4 %)**

Composition	Quantité pour 10 ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>- H<sub>2</sub>O distillée</li> <li>- Solution acrylamide/bis-acrylamide 40% (Merck)</li> <li>- Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 (Sigma-Aldrich)</li> <li>- SDS 10 % (sodium dodecyl sulfate; Sigma-Aldrich)</li> <li>- APS 10 % (ammonium persulfate; Sigma-Aldrich)</li> <li>- TEMED (tétraméthyléthylènediamine; Merck)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6 ml</li> <li>1,33 ml</li> <li>2,5 ml</li> <li>100 µl</li> <li>100 µl</li> <li>10 µl</li> </ul>

**Gel de séparation (10 %)**

Composition	Quantité pour 10 ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>- H<sub>2</sub>O distillée</li> <li>- Solution acrylamide/bis-acrylamide 40% (Merck)</li> <li>- Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8 (Sigma-Aldrich)</li> <li>- SDS 10 % (sodium dodecyl sulfate; Sigma-Aldrich)</li> <li>- APS 10 % (ammonium persulfate; Sigma-Aldrich)</li> <li>- TEMED (tétraméthyléthylènediamine; Merck)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4 ml</li> <li>3,3 ml</li> <li>2,5 ml</li> <li>100 µl</li> <li>100 µl</li> <li>10 µl</li> </ul>

gras (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Les agrégats de sonde sont ensuite éliminés par centrifugation à 14 000 rpm pendant 5 minutes.

Concernant le marquage en surface des microdomaines lipidiques, les cellules sont lavées deux fois dans du milieu complet Epilife® froid (4°C) et ensuite incubées 15 minutes à 4°C avec la solution de lysénine. Une fois le marquage en surface cellulaire effectué, les cellules sont lavées trois fois avec du milieu complet Epilife® et ensuite fixées pendant 15 minutes dans de la PFA. L'analyse immunofluorescente d'IL-4R $\alpha$  est ensuite effectuée comme décrit ci-dessus, excepté que, pour ce co-marquage, l'anticorps reconnaissant IL-4R $\alpha$  [Tableau 4] est laissé en présence des cellules pendant 2 h à température ambiante.

## **6 Analyse des protéines par la méthode du Western blot**

### **Principe**

Le Western blot est une technique semi-quantitative permettant de détecter la présence et l'abondance d'une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Il est également possible d'analyser simultanément plusieurs échantillons protéiques permettant ainsi de réaliser aisément des comparaisons d'expressions protéiques. Cette détection repose sur la reconnaissance d'un système d'anticorps couplé à une peroxydase. L'ajout du substrat de cette enzyme entraîne une réaction de chimioluminescence visible à l'aide d'une technologie d'imagerie. La luminescence émise est proportionnelle à la quantité de protéines sondées.

### **6.1 Extraction des protéines**

#### **Culture en monocouches :**

Après les différents traitements, les cultures cellulaires dont le milieu a été préalablement aspiré, sont conservées à -80°C. Les kératinocytes sont lysés sur glace avec 150  $\mu$ l de tampon de lyse [Tableau 5] et à l'aide d'un grattoir rincé soigneusement entre chaque condition. Il est impératif de travailler à 4°C pour inhiber l'activité des protéases. Les lysats cellulaires sont placés dans un bain à ébullition pendant 5 minutes puis centrifugés pendant 3 minutes, à 10 000 rpm et à 4°C. Les surnageants sont collectés et conservés à -20°C.

#### **Culture d'épiderme humain reconstruit :**

Les épidermes obtenus après 11 jours de croissance sont traités et ensuite conservés à -80°C. Le filtre en polycarbonate sur lequel est ancré le RHE est découpé délicatement à l'aide d'un scalpel. Le filtre et le tissu sont transférés dans un tube contenant 200  $\mu$ l de tampon de lyse en veillant à orienter le tissu en reconstruction vers l'intérieur du tube. L'échantillon est ensuite placé dans un bain à ébullition pendant 5 minutes. Cette étape permet de détacher l'épiderme du filtre en polycarbonate. Un embout de micropipette est ensuite utilisé afin de récolter le reste des cellules adhérentes au filtre. L'échantillon contenant le lysat cellulaire est à nouveau déposé dans un bain marie à 100°C pendant 2 minutes avant d'être centrifugé pendant 5 minutes, à 10 000 rpm et à 4°C. La centrifugation permet de culoter les débris cellulaires dont principalement la couche cornée et le filtre en polycarbonate. Le surnageant récolté est ensuite conservé à -20°C.

### **6.2 Dosage de la concentration en protéines selon la technique de Pierce**

La concentration totale en protéines des extraits est mesurée sur base d'une réaction colorimétrique. L'absorbance des échantillons obtenue par spectrophotométrie permet de déterminer la concentration protéique tout en se référant à une droite d'étalonnage. Celle-ci

**Solution de migration (10x)**

Composition	Quantité pour 1 L
- Tris-Base 25 mM, pH 8,3 (UCB, Bruxelles, Belgique)	30 g
- Glycine 192 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)	144 g
- SDS 0,1 % (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)	10 g
- H <sub>2</sub> O distillée	QSP 1 L de solution

**Solution de transfert**

Composition	Quantité pour 1 L
- Tris-Base 25 mM, pH 8,3 (UCB, Bruxelles, Belgique)	3,03 g
- Glycine 192 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)	14,4 g
- Méthanol 20% (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)	200 ml
- H <sub>2</sub> O distillée	QSP 1 L de solution

**TBS 10x (Tris Buffer Saline)**

Composition	Quantité pour 1 L
- Tris-Base 25 mM, pH 8,3 (UCB, Bruxelles, Belgique)	30,285 g
- KCL 2,7 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)	2,23 g
- NaCl 140 mM (VWR International, Pennsylvanie, USA)	81,81 g
- pH 7,6	
- H <sub>2</sub> O distillée	QSP 1 L de solution

**Tableau 8 : Anticorps pour la détection de protéines en Western blot**

Anticorps	Firme et référence	Isotype	Source	Dilution
RPL13a	Cell Signaling Technology (#2765)	Polyclonal	Lapin	1:1000
ERK1/2	Cell Signaling Technology (#9102)	Polyclonal	Lapin	1:1000
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology (#9106)	Monoclonal	Souris	1:1000
P38	Cell Signaling Technology (#9212)	Polyclonal	Lapin	1:1000
pP38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology (#9211)	Polyclonal	Lapin	1:1000
STAT6	Cell Signaling Technology (#9362)	Polyclonal	Lapin	1:1000
pSTAT6 (Tyr641)	Cell Signaling Technology (#9361)	Polyclonal	Lapin	1:1000
IL-4Rα	R&D Systems (mAb 230)	Monoclonal	Souris	1:500
Anti-IgG de souris couplé à la HRP	Cell Signaling Technology (#7076)	Polyclonal	Cheval	1:1000
Anti-IgG lapin couplé à la HRP	Cell Signaling Technology (#7074)	Polyclonal	Chèvre	1:1000

est réalisée sur base de l'absorbance d'une protéine standard, l'albumine de sérum bovin (BSA) dont la concentration stock est connue. En pratique, 5 µl d'échantillon dilué 2x sont déposés dans une plaque 96 puits avant d'ajouter 75 µl de solution Pierce (Pierce protein assay ; Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). La plaque est préservée de la lumière et mise à agiter 10 minutes avant de réaliser sa lecture au spectrophotomètre ((VersaMax de Molecular Devices, Berkshire, Royaume Uni), à une longueur d'onde de 660 nm.

### **6.3 Électrophorèse et transfert** [Tableaux 6, 7 et 8]

Les protéines sont chargées sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS, détergent puissant, et séparées par électrophorèse selon leur poids moléculaire. Par leur liaison avec le SDS, les protéines sont complètement dépliées et portent une charge négative apparente, leur permettant de migrer à l'intérieur du gel sous l'influence d'un champ électrique. Le gel d'électrophorèse SDS-PAGE se compose de deux types de gel de polyacrylamide, différant l'un de l'autre tant dans leur composition (pH et concentration en acrylamide) que dans leur fonction. Le gel d'empilement, plus lâche, permet de concentrer les échantillons alors que le gel de séparation, plus réticulé, sert de tamis moléculaire et permet ainsi de séparer les protéines.

Les protéines extraites sont suspendues dans du tampon Laemmli à raison de 20 µg ou de 25 µg. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 3 minutes dans un bain marie à 100°C afin de les dénaturer, puis déposés sur le gel. La migration se fait dans du tampon d'électrophorèse (1x ; cfr tableau) durant 1h30 à 120 V. Le bleu de bromophénol contenu dans le tampon Laemmli permet d'indiquer le front de migration électrophorétique.

Ensuite le transfert des protéines du gel sur une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) est effectué. Cette étape a pour but de faciliter l'accès des anticorps aux protéines lors de la révélation. Le transfert protéique est réalisé en immersion dans du tampon de transfert pendant toute une nuit à 60 V. L'efficacité du transfert peut être vérifiée en effectuant une coloration réversible au rouge ponceau.

La membrane est bloquée pendant minimum 1 h à température ambiante dans du lait sans matière grasse (poudre de lait Nestlé) dilué à 5 % dans du TBS contenant 0,1 % de Tween 20. Les protéines inertes présentes dans le lait permettent de bloquer les sites d'interaction non spécifiques et ainsi de réduire le bruit de fond lors de la révélation. Cette étape de saturation est suivie de 3 rinçages de la membrane dans du TBS-Tween 0,1% (solution de rinçage). La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation durant toute une nuit, à 4°C et avec une agitation douce. Les anticorps primaires utilisés sont répertoriés dans le [Tableau 8]. La membrane est lavée comme précédemment avant d'être incubée en présence de l'anticorps secondaire spécifique couplé à une peroxydase du raifort (HRP) et dilué dans la solution de saturation. Au terme d'1 h d'incubation à température ambiante, la membrane est rincée avant la révélation des protéines d'intérêt immunomarquées. Ces protéines sont détectées grâce à une réaction de chimioluminescence (BM chemiluminescence blotting substrate ; Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) visualisée par une caméra CCD du système d'imagerie numérique ImageQuant Las 4000 mini (GE Healthcare Biosciences, Diegem, Belgique). Les images numérisées sont analysées et quantifiées à l'aide du logiciel Bio-Rad Quantity One (Bio-Rad laboratories, Californie, USA).

L'analyse de l'IL-4Rα par Western blot requiert de travailler en conditions non-réductrices. Les cellules sont exploitées comme décrit ci-dessus mais la composition des tampons de lyse et de charge Laemmli a été adaptée. Ainsi, le tampon de lyse contient un agent détergent non-dénaturant (Igepal ; tableau) et les agents réducteurs (DTT) ont été retirés du tampon Laemmli. Les étapes de dénaturation protéique par la chaleur ont également été supprimées.





## **7 Analyse de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel**

### **Principe**

La PCR quantitative en temps réel permet d'analyser la variation d'expression de transcrits entre différentes conditions expérimentales et une condition contrôle définie comme « calibrateur ». Cette technique nécessite la rétro-transcription de l'ARN extrait en ADN complémentaire. L'ADN obtenu est alors amplifié au cours d'une quarantaine de cycles par PCR (Polymerase Chain Reaction). Celle-ci consiste en la synthèse d'un grand nombre de fragments d'ADN grâce à une Taq polymérase, à des amorces spécifiques au gène d'intérêt et à des nucléotides. La quantité relative d'amplicons est déterminée sur base de la fluorescence émise suite à la liaison aux fragments d'ADN double brin d'un agent intercalant, le SybrGreen. La notion de Cq est utilisée dans le contexte de la PCR. Le Cq se définit comme étant le plus petit nombre de cycles nécessaires pour lequel le signal fluorescent se distingue du bruit de fond. Les valeurs de Cq de chacune des conditions expérimentales sont normalisées et relativisées.

Il est impératif de travailler en conditions RNase free afin d'éviter toute dégradation des échantillons par les RNases pour les manipulations décrites ci-dessous.

### **7.1 Extraction de l'ARN total**

#### **Culture en monocouches :**

Les ARN totaux sont extraits des cultures en monocouches en utilisant le kit "High pure RNA isolation" (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont recouvertes de 400 µl de tampon de lyse. La lyse cellulaire et l'inactivation des RNases sont permises par l'action de détergents et d'agents chaotropiques (guanidine) contenus dans le tampon. Les lysats obtenus sont déposés sur des colonnes de purification fournies avec le kit, ayant la propriété de retenir spécifiquement les acides nucléiques. Une étape d'incubation de 15 minutes avec la DNase est ensuite réalisée afin de digérer l'ADN génomique contaminant. Les impuretés résiduelles sont éliminées grâce à l'application de tampons de lavage à plusieurs reprises au cours de la procédure. L'ARN isolé est élué de la colonne et sa concentration est quantifiée par spectrophotométrie (NanoDrop 1000 ; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) à une longueur d'onde de 260 nm. La pureté des extraits est évaluée selon les rapports entre la densité optique à 260 nm et à 280 ou 230 nm, renseignant respectivement sur la contamination en protéines et/ou en sels des échantillons d'ARN. Les ARNs extraits sont conservés à -80°C.

#### **Culture d'épiderme humain reconstruit :**

La purification de l'ARN des épidermes reconstruits est réalisée avec le kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Les filtres de polycarbonate portant les RHE sont découpés à l'aide d'un scalpel et déposés dans une plaque de 24 puits contenant 600 µl de tampon de lyse suppléé en  $\beta$ -mercaptoéthanol afin de dénaturer les RNases. À la suite d'une période d'incubation de 1 à 2 minutes dans le tampon de lyse, la couche cornée se sépare spontanément des autres couches épidermiques. Celle-ci est éliminée car sa présence diminue le rendement d'extraction. Le lysat cellulaire auquel a été ajouté de l'éthanol 70% est déposé sur une colonne d'extraction. L'ajout d'éthanol 70 % fournit des conditions optimales de liaison des acides nucléiques à la membrane de la colonne. Une étape d'incubation avec la DNase ainsi que différentes étapes de lavage de la colonne sont également réalisées. Après élution de l'ARN, les extraits sont conservés à -80°C.

**Tableau 9 : Produits nécessaires pour la rétro-transcription de l'ARNm en cDNA****Kit SuperScript III RNase H – Reverse Transcriptase (Invitrogène, Californie, USA)****Composition**

- OligodT 0,5 µg/ml
- dNTP (désoxy-nucléotides triphosphate) 10 mM de chacun des nucléotides
- DTT (dithiotréitol) 0,1 M
- SuperScript III RNase H reverse transcriptase 200 U/µl
- 5x First Strand buffer :
  - Tris-HCl 250 mM
  - KCl 375 mM
  - MgCl<sub>2</sub> 15 mM

**Tableau 10 : Primers utilisés pour la réaction PCR en temps réel**

Symbol gène	Gène d'intérêt	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (3'-5')	Concentration
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0	ATC AAC GGG TAC AAA CGA GTC	CCT TCT TGG CTG ATC CAT CTG	300 nM
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	TGG CCC TCC ACT CCT CAT C	AGC TAG GAT GGT TCT GTG ACC C	300 nM
IL-8	Interleukin-8	GCA GAG GGT TGT GGA GAA GTT T	AAC CTA TGG TGT CTC TTA CTT AAA AA	300 nM
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin	CGC GTC GCT CGC CAA AGA AA	CAA GGA TTG TGG CGT CGC TTC A	300 nM
IL-4Rα	Interleukin-4 receptor alpha chain	GCG TCT CCG ACT ACA TGA GC	CCA ACG AGG TCC AGT CGT CG	300 nM
IL-13Rα1	Interleukin-13 receptor alpha 1 chain	ACC CGA GGG AGC CAG CTC A	GTG GGG TCC CAG TGT AGC ACC	300 nM
IL-13Rα2	Interleukin-13 receptor alpha 2 chain	ATA CCT TTG GGA CCT ATT CC	ACT TGT AAA CCG GTA CTG AC	300 nM
FLG	Filaggrin	GGG CAC TGA AAG GCA AAA AG	GTG GTA TTA GTA TTA GAC GTG ATG GT	300 nM
LOR	Loricrin	TCA TGA TGC TAC CCG AGG TTT G	GTC TTG ATC TAC GTC GGC CTC T	300 nM
CA2	Carbonic anhydrase 2	AAC AAT GGT CAT GCT TTC AAC G	ACA GGT AGT TCA CTT GGG GTC	300 nM
NELL2	Neural epidermal growth factor like 2	TAA GGG TAT AAT GCA AGA TGT CCA ATT	TCT AGA CCC GTG ACT CGT TAT TT	300 nM

## **7.2 Synthèse d'ADNc par rétro-transcription**

Cette étape permet la synthèse d'ADN complémentaire à partir d'amorces hybridées sur les ARNm. L'appariement d'amorces polydT aux queues polyA des ARNm sert de substrat à la transcriptase reverse (ADN polymérase ARN dépendante) qui synthétise alors un brin d'ADNc sur base du brin matrice d'ARNm.

En pratique, 1 µg d'ARN total extrait est rétro transcrit en ADN complémentaire en utilisant le kit SuperScript II RNase H – Reverse Transcriptase (Invitrogen, Californie, USA) [Tableau 9].

Les amorces oligodT ainsi que les dNTPs sont ajoutés aux échantillons d'ARN dilués dans de l'eau RNase free puis placés à 65°C pendant 5 minutes. À cette température, l'ARN est dénaturé, facilitant ainsi l'accès et permettant l'hybridation des amorces aux queues

L'hybridation des amorces oligodT aux queues polyA des ARNm, dénaturés, est réalisée à 65°C, durant 5 minutes. L'enzyme SuperScript II Reverse Transcriptase est ensuite ajoutée aux échantillons en présence du tampon First-Strand et du DTT. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 50 minutes à 42°C, température à laquelle l'activité de l'enzyme est optimale. Cette étape correspond à la polymérisation/la transcription d'ADNc. Au terme des 50 minutes, la température est augmentée à 72°C pendant 15 minutes pour inactiver l'enzyme. L'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

## **7.3 PCR en temps réel**

L'ADNc synthétisé est dilué dans de l'eau RNase free afin d'obtenir une concentration de 2 ng/µl. 5 µl de cet ADNc dilué (10 ng) est amplifié en présence d'un mélange contenant 2,5 µl de chaque amorce (300 nM, amorces sens et anti-sens ; Eurogentec, Liège, Belgique) et de 10 µl de FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Ce dernier contient l'enzyme Taq polymérase (ADN dépendante), le tampon de réaction, des dNTPs et le SyBrGreen. Ainsi, 20 µl sont engagés pour chaque réaction PCR dans le LightCycler® 96 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Une plaque contenant ainsi dans ses différents puits, 5 µl d'ADNc et 15 µl du mix spécifique au gène d'intérêt, est placée dans le LightCycler® 96 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) après avoir été centrifugée pendant 3 minutes à 1200 rpm. Les séquences des amorces sont indiquées dans le [Tableau 10].

Chaque réaction d'amplification PCR correspond à une étape de désappariement des brins d'ADNc pendant 10 minutes à 95°C, suivie de 45 cycles répartis entre la dénaturation des brins d'ADN pendant 10 secondes à 95°C, l'hybridation des amorces pendant 10 secondes à 60°C et l'élongation par la Taq polymérase pendant 10 secondes à 72°C, température optimale pour l'activité de l'enzyme. La quantité d'ADN double à chaque cycle d'amplification.

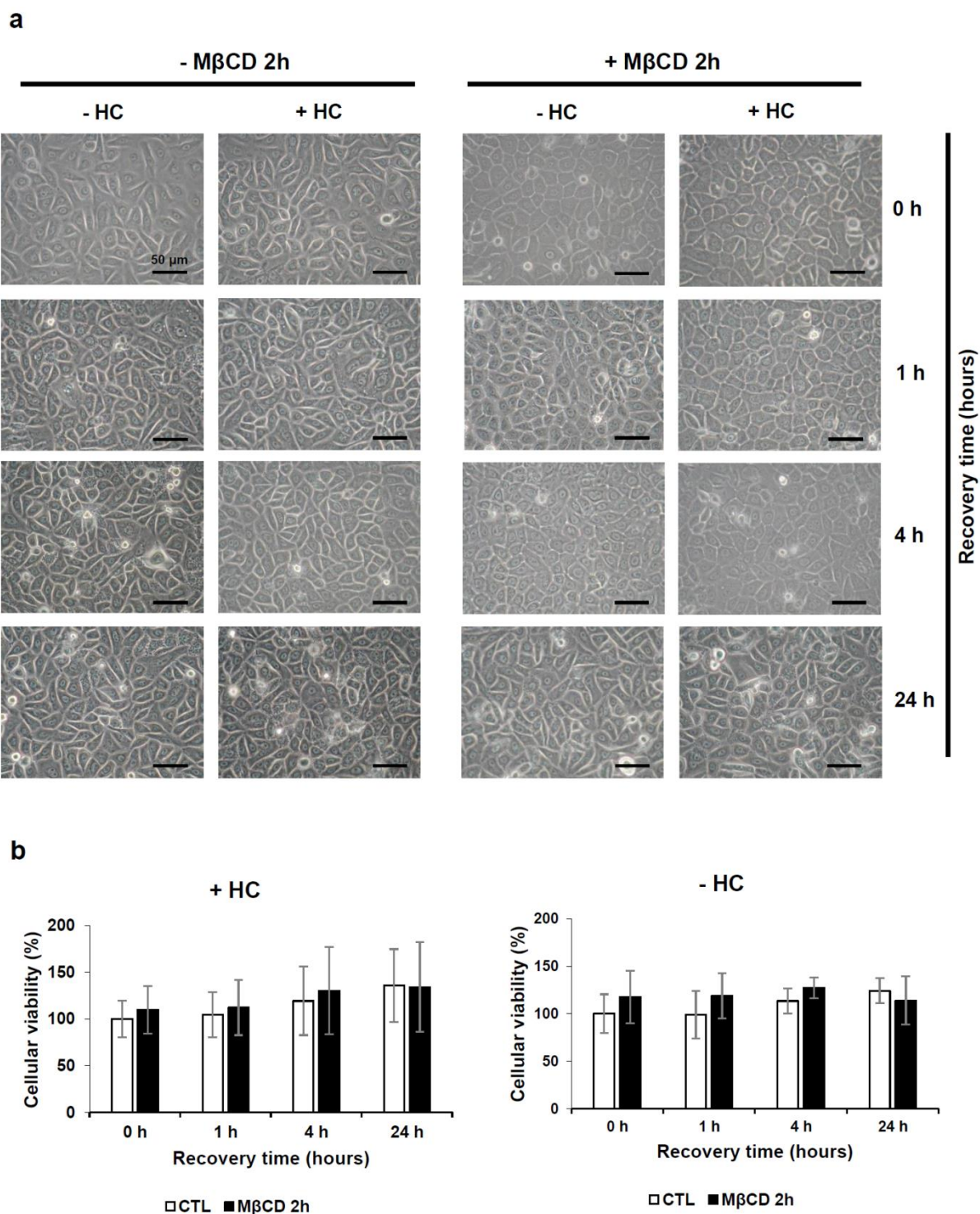
Différents contrôles négatifs sont réalisés. L'un d'eux consiste à déposer 5 µl d'eau RNase free à la place de l'ADNc pour chaque gène analysé/étudié. Un second contrôle correspond à remplacer l'ADNc par de l'ARN total pour chacune des conditions afin de détecter une éventuelle contamination par de l'ADN génomique. Tous les échantillons sont déposés en duplicatas au minimum.

L'expression relative est déterminée en normalisant les niveaux d'ARNm à l'expression en ARNm d'un gène de référence, RPLP0. Le gène de référence correspond à un gène dont l'expression n'est pas influencée par les conditions de traitements et donc reste stable. La quantification des différences entre les échantillons est basée sur la méthode du  $\Delta\Delta C_q$  (cycle threshold). Une valeur seuil ( $C_q$ ) est déterminée pour chacun des échantillons. Au plus le nombre de cycles nécessaires pour dépasser cette valeur est faible, au plus la présence d'ADN



d'intérêt amplifié est importante. Pour chaque échantillon, la valeur Cq du gène de référence est soustraite à celle du gène d'intérêt. Le résultat de cette normalisation est le  $\Delta Cq$ . Ensuite, afin de relativiser les valeurs par rapport à la condition contrôle de l'expérience, le  $\Delta Cq$  de celle-ci est soustrait à chacun des  $\Delta Cq$  des échantillons de l'expérience. Les différences obtenues sont appelées les  $\Delta\Delta Cq$ . Les variations relatives (fold changes) des niveaux d'expression en ARNm sont ensuite déterminés en réalisant l'opération  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

Pour vérifier la spécificité de l'amplification, des courbes de dissociation sont réalisées.



**Figure 1 : Morphologie (a) et de la viabilité (b) cellulaires des kératinocytes humains arrivés à confluence et déplétés du cholestérol. (a, b)** Les cellules confluentes sont laissées non traitées ou sont traitées 2h avec de la M $\beta$ CD (7,5 mM) avant d'être incubées dans du milieu de culture frais pour plusieurs périodes de récupération (0h, 1h, 4h et 24h). Les cellules sont cultivées en présence ou en absence de  $5.10^{-7}$  M d'hydrocortisone (HC). **(a)** La morphologie cellulaire est évaluée en utilisant un microscope à contraste de phase. Chaque micrographie est représentative de trois expériences indépendantes ( $n = 3$ ). Barre d'échelle = 50  $\mu$ m (grossissement 40x). **(b)** La viabilité cellulaire des kératinocytes mis en présence de M $\beta$ CD pendant 2h dans un milieu avec ou sans HC est évaluée par test MTT. Les données sont présentées comme la moyenne de triplicats et en pourcentage de la viabilité cellulaire mesurée par test MTT. Les données sont exprimées par rapport aux cellules contrôles (0h) considérées comme représentant 100% de la viabilité cellulaire. Les données sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SD relative de trois expériences indépendantes ( $n = 3$ ).

Un effet synergique pour activer les kératinocytes et altérer la barrière formée a été observé dans le modèle d'épiderme reconstruit, lors de la combinaison du traitement à la M $\beta$ CD et de la stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25. Afin de comprendre les mécanismes de cette synergie, ce mémoire vise à étudier la régulation des récepteurs aux interleukines IL-4 et IL-13 dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques. Notre approche a été dans un premier temps d'examiner, dans un modèle plus simple de monocouches, l'implication directe de la déplétion du cholestérol sur la régulation des récepteurs. Cette analyse s'est poursuivie ensuite dans le modèle d'épiderme reconstruit sous les mêmes conditions que celles rencontrées lors de l'observation de l'effet synergique. Cette seconde partie de notre recherche est destinée à investiguer l'influence de la déplétion du cholestérol sur la stimulation aux interleukines subséquente et en analysant, plus précisément, l'expression des récepteurs et signalisation associée ainsi que leur localisation au sein de l'épiderme reconstruit. Notre attention s'est également portée sur les interactions éventuelles entre les voies impliquées dans la déplétion du cholestérol et la stimulation par les IL-4, IL-13 et IL-25.

## **A. Étude de la régulation des récepteurs dans un modèle de kératinocytes en monocouches**

La première étape de notre travail a été de transposer aux cultures de kératinocytes en monocouches certaines conditions expérimentales utilisées pour mimer la DA dans les RHE. Dans ce modèle en RHE, les kératinocytes sont traités séquentiellement avec la M $\beta$ CD pendant 2h et, pendant les 48h qui suivent, avec un mélange d'interleukines liées à la réponse Th2 (IL-4, IL-13 et IL-25). En suivant cette procédure, les kératinocytes sont d'abord activés par la déplétion en cholestérol qui induit une production de TSLP. La réaction du système immunitaire est ensuite mimée par l'ajout des cytokines exogènes associées à la réponse immunitaire Th2. Cette augmentation de l'expression de TSLP nécessite 2h de traitement avec la M $\beta$ CD et un milieu de culture exempté d'hydrocortisone (HC) (Landheer et al., 2015). Ces deux paramètres sont par conséquent utilisés pour reproduire l'activation des kératinocytes et l'expression de TSLP dans un modèle plus simple, proposé à travers des cultures de kératinocytes en monocouches.

### **1 Déplétion du cholestérol dans un modèle de kératinocytes en monocouches**

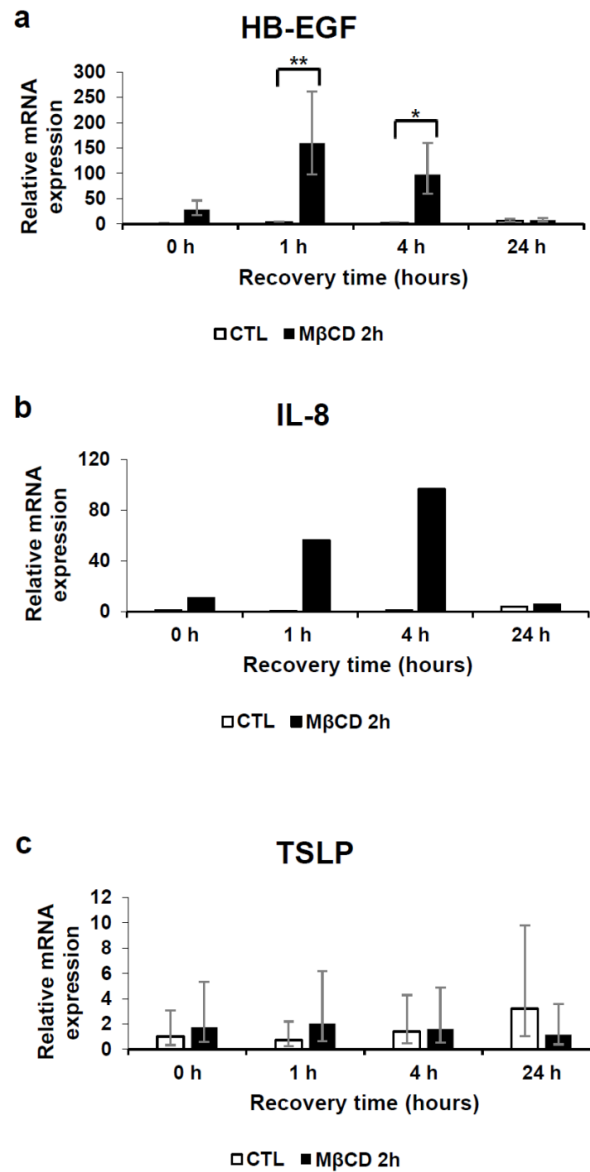
Pour ce modèle en monocouches, basé sur les conditions dans lesquelles l'expression de TSLP est augmentée, les kératinocytes sont cultivés et placés en milieu autocrine dépourvu d'HC jusqu'à ce qu'ils atteignent la confluence. Les cellules sont alors incubées pendant 2h dans la M $\beta$ CD et récupèrent ensuite ou non (0h) pendant 1h, 4h ou 24h.

#### **1.1 Transposition de la déplétion du cholestérol des modèles en RHE aux cultures de kératinocytes en monocouches**

##### **1.1.1 Analyse de la morphologie et de la viabilité cellulaires**

La morphologie cellulaire des kératinocytes suite au traitement avec la M $\beta$ CD sans HC est d'abord analysée pour estimer l'efficacité de la déplétion du cholestérol et l'incidence de 2h d'incubation avec la M $\beta$ CD et l'absence d'HC dans le milieu de culture. Cette procédure permet d'évaluer rapidement la santé cellulaire après 2h d'incubation en présence de la M $\beta$ CD et après des périodes de récupération de plus en plus longues. Les kératinocytes qui n'ont pas été soumis à la déplétion du cholestérol montrent une morphologie cellulaire





**Figure 2 : Expression relative en ARNm de cibles transcriptionnelles de la déplétion du cholestérol (a, b) et du gène marqueur de DA, TSLP (c) dans des kératinocytes confluents et traités. (a-c)** Des cultures confluentes de kératinocytes sont laissées non traitées ou sont traitées avec la MβCD (7,5 mM) pendant 2h. Les cellules sont ensuite incubées dans du milieu de culture frais pour différentes périodes de récupération (0h, 1h, 4h et 24h). L'ARN total est extrait de chaque culture, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR. Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée 0h pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. **(a, c)** Concernant l'analyse de l'expression relative de HB-EGF et TSLP, les barres d'erreur représentent un intervalle de confiance de 95% ; une analyse statistique ANOVA2 *repeated measures* a été réalisée sur les ΔCq (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; n = 3 expériences indépendantes). **(b)** L'analyse de l'expression relative de IL-8 a été effectuée au cours d'une expérience.

normale attendue au cours du temps, à savoir, des cellules épithéliales polyédriques et jointes. Les kératinocytes, suite à la déplétion du cholestérol, montrent une morphologie altérée comme été précédemment décrit (Jans et al., 2004; Thomas, Depiereux, & Poumay, 2012). L'examen des altérations révèle que les kératinocytes semblent moins jointifs, comme le montre la légère augmentation des espaces intercellulaires. Cependant, ces altérations morphologiques induites par la M $\beta$ CD apparaissent déjà moins évidentes après 4h de temps de récupération et disparaissent complètement après 24h (Fig 1 a). En revanche, le retrait d'HC du milieu de culture n'a pas d'effet sur la morphologie des cellules.

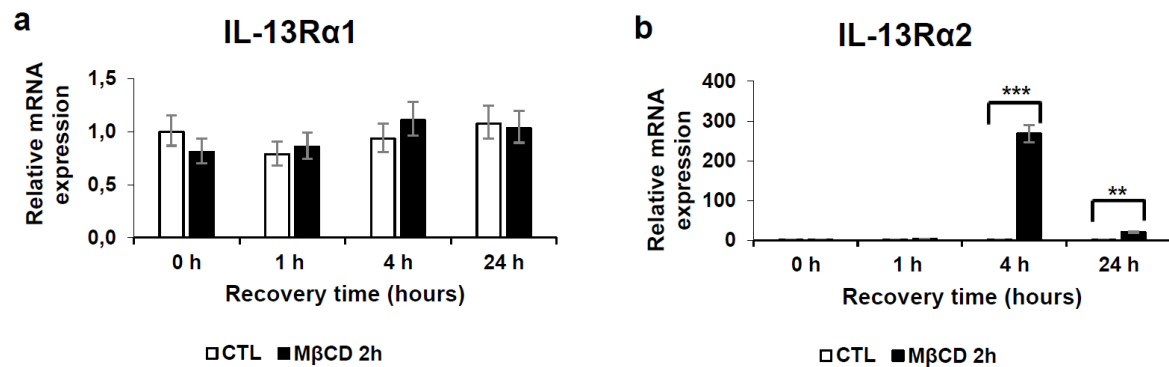
Des études antérieures ont rapporté que la déplétion du cholestérol de la membrane plasmique des kératinocytes confluents, obtenue après 1h d'incubation en présence de la M $\beta$ CD, n'induit pas d'effets cytotoxiques (Giltaire et al., 2011). Le dosage de la viabilité cellulaire par le test MTT est réalisé pour estimer si un temps d'incubation plus long en présence de la M $\beta$ CD et dans un milieu de culture dépourvu d'HC pouvait être délétère aux cellules. Nos résultats montrent que la viabilité cellulaire des kératinocytes confluents n'est pas affectée par une période d'incubation de 2h dans la M $\beta$ CD ainsi qu'au cours des différentes périodes de récupération. De même, la densité des cellules viables n'est pas affectée par le retrait d'HC du milieu de culture (Fig 1 b). Une plus longue incubation dans la M $\beta$ CD et l'absence d'HC n'induisent pas de cytotoxicité sur les cultures confluentes de kératinocytes. Les variations de pourcentage de viabilité cellulaire constatées entre les conditions traitées et non traitées à la M $\beta$ CD pourraient s'expliquer par une prolifération cellulaire augmentée suite à la déplétion du cholestérol (Portilho et al., 2012) ainsi que par une augmentation de la densité cellulaire au cours des périodes analysées.

### **1.1.2 Validation par RT-qPCR de l'expression de gènes différentiellement régulés en réponse à la déplétion du cholestérol**

Pour s'assurer de l'efficacité du traitement à la M $\beta$ CD et en complément à l'analyse portant sur la morphologie et la viabilité cellulaires, nous avons étudié l'expression d'HB-EGF, une cible majeure régulée par la M $\beta$ CD. L'expression du gène encodant HB-EGF a été démontrée fortement induite durant les premières heures de la phase de récupération des kératinocytes en monocouches, traités préalablement pendant 1h avec la M $\beta$ CD (Mathay et al., 2008; Mathay et al., 2011). Dans les kératinocytes confluents exposés à 2h de stress cellulaire avec la M $\beta$ CD, l'induction maximale de l'expression du gène HB-EGF apparaît 1h après le traitement et reste significativement élevée après 4h de récupération (Fig 2 a) avant de revenir à son niveau basal d'expression après 24h de récupération. De plus, la comparaison entre 1h et 2h de traitements avec la M $\beta$ CD montre que l'expression du gène HB-EGF apparaît similaire dans les deux conditions. Toutefois, bien que la régulation transcriptionnelle d'HB-EGF suit le même type de profil d'expression lors des deux traitements, son expression associée aux 4h de récupération après 2h d'incubation avec la M $\beta$ CD est largement supérieure (+ ~160 fois d'expression relative) à celle associée à 1h d'incubation (+ ~30 fois d'expression relative) (Mathay et al., 2008).

L'expression en ARNm de IL-8, régulée suite au traitement par la M $\beta$ CD, a été également investiguée. L'expression de IL-8 augmente graduellement jusqu'à 4h de récupération et diminue ensuite rapidement (Fig 2 b). Cette expérience n'a été réalisée qu'une fois mais confirme un profil semblable à celui associé à l'expérience reposant sur 1h de traitement (Mathay et al., 2011).

L'absence d'effets cytotoxiques et une efficacité convenable ayant été associées aux 2h de traitement avec la M $\beta$ CD et sans HC, il convient alors de vérifier si une augmentation de l'expression de TSLP peut être également observée dans les cultures en monocouches. De



**Figure 3 -1 : Expression relative en ARNm de IL-13Rα1 (a) et IL-13Rα2 (b) dans des kératinocytes confluents et déplétés du cholestérol. (a, b)** Des cultures confluentes de kératinocytes sont laissées non traitées ou sont traitées avec la MβCD (7,5 mM) pendant 2h. Les cellules sont ensuite incubées dans du milieu de culture frais pour différentes périodes de récupération (0h, 1h, 4h et 24h). L'ARN total est extrait de chaque culture, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR. Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée 0h pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. Les barres d'erreur représentent un intervalle de confiance de 95% ; une analyse statistique ANOVA2 *repeated measures* a été réalisée sur les ΔCq (\*\*P < 0,01; n = 3 expériences indépendantes).

façon inattendue, aucun changement significatif de l'expression de cette cytokine après 2h de traitement par la M $\beta$ CD n'est constaté. Ainsi, les résultats obtenus en monocouches ne concordent pas avec les résultats obtenus dans les RHE. L'absence d'augmentation de l'expression de TSLP après le traitement de 2h par la M $\beta$ CD pourrait représenter une première limitation à l'utilisation du modèle en monocouches pour tester notre hypothèse de travail (Fig 2 c).

Après cette analyse préliminaire, la régulation de IL-4R et IL-13R a été investiguée dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques au sein des kératinocytes cultivés en monocouches. Celles-ci sont soumises à un traitement de 2h avec la M $\beta$ CD dans un milieu de culture autocrine sans HC et récupèrent ou non pendant différentes périodes.

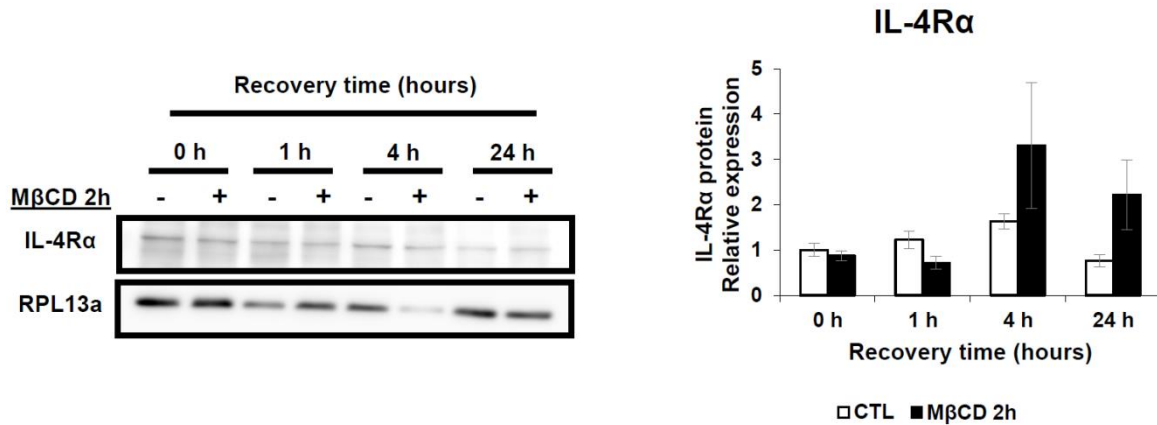
## **1.2 Effets de la déplétion du cholestérol sur l'expression des chaines de récepteurs IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2**

### **1.2.1 Analyse de l'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2**

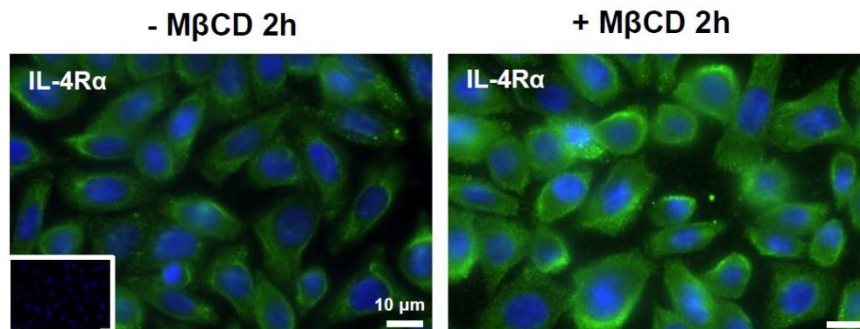
Les récepteurs aux interleukines concernés dans cette étude correspondent au complexe hétérodimérique IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$  et au récepteur sous forme monomérique, IL-13R $\alpha$ 2. L'expression en ARNm de ces trois chaines a été analysée sur des cultures de kératinocytes arrivées à confluence après traitement ou non par la M $\beta$ CD. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt mesurés sont ensuite normalisés par rapport au niveau d'expression d'un gène de référence RPLP0. L'expression en ARNm de IL-13R $\alpha$ 1 a d'abord été analysée lors des différentes périodes de récupération après traitement par la M $\beta$ CD. L'expression de IL-13R $\alpha$ 1 n'a pas été trouvée altérée en réponse au stress cellulaire associé à la perturbation des microdomaines lipidiques puisque la déplétion du cholestérol n'affecte pas son niveau d'ARNm (Fig 3-1 a). Les niveaux d'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$  ont aussi été analysés par RT-qPCR, mais aucune expression pertinente de cette chaîne de récepteur n'a pu être mesurée avec succès en raison de difficultés rencontrées au niveau de la conception d'amorces spécifiques. Plusieurs paires d'amorces différentes ont été testées sans pour autant fournir une amplification correcte et précise d'une région spécifique de IL-4R $\alpha$ . Une explication possible serait d'envisager la trop faible expression de ce récepteur. Son expression en ARNm nécessite dès lors des mises au point.

L'expression du récepteur monomérique IL-13R $\alpha$ 2 a également été étudiée en raison de sa surexpression importante en réponse à la déplétion du cholestérol (Mathay et al., 2011) ou chez les patients atteints de DA (Lu et al., 2009) ainsi que de son affinité de liaison à IL-13 supérieure à celle du complexe IL-13R $\alpha$ 1/IL-13. Tous ces éléments font de cette chaîne une cible intéressante à analyser. Dans les kératinocytes confluent exposés à 2h de stress cellulaire avec la M $\beta$ CD, l'expression en ARNm de IL-13R $\alpha$ 2 n'augmente pas directement à la suite du traitement. Elle se révèle être maximale 4h après le traitement et reste significativement élevée après 24h de récupération (Fig 3-1 b), malgré une forte diminution de son niveau d'expression.

Le récepteur IL-13R $\alpha$ 2 paraît dès lors fortement affecté par la perturbation de microdomaines lipidiques et l'importance de cette induction fait de ce récepteur un acteur potentiel clé dans l'étude de l'influence des microdomaines lipidiques sur la régulation des récepteurs aux IL-4 et IL-13 et leur signalisation. IL-13R $\alpha$ 2 représente donc un élément non négligeable à la compréhension de l'amélioration d'un phénotype cellulaire dans un contexte de déplétion du cholestérol de la membrane plasmique et de stimulation aux interleukines.



**Figure 3-2 : Expression protéique de IL-4Rα après déplétion du cholestérol membranaire de kératinocytes en monocouches.** Les kératinocytes confluents sont incubés ou non pendant 2h en présence de MβCD (7,5 mM). Les kératinocytes déplétés du cholestérol sont placés dans du milieu frais pour différentes périodes de récupération (0h, 1h, 4h et 24h). L'expression protéique de IL-4Rα est déterminée à partir de lysats cellulaires de kératinocytes traités par Western blot sous des conditions non-réductrices. Les bandes spécifiques à IL-4Rα sont quantifiées et analysées à des temps déterminés après incubation ou non avec la MβCD. Les résultats sont normalisés aux signaux protéiques de la protéine ribosomale RPL13a utilisée comme contrôle de charge. Les données sont représentées comme la moyenne  $\pm$  la SEM relative de trois expériences indépendantes (ANOVA2 *repeated measures* ; n = 3).



**Figure 4-1 : Localisation de IL-4Rα dans des kératinocytes déplétés du cholestérol.** Les kératinocytes arrivés à confluence sont traités ou non pendant 2h en présence de MβCD (7,5 mM). Les cellules sont fixées avec du PFA 4% et perméabilisées avec du PBS contenant 1% de Triton X-100. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre IL-4Rα, suivi par l'anticorps secondaire conjugué à AlexaFluor 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec le Hoechst (bleu). Les images des contrôles négatifs correspondant à l'incubation des cellules en présence uniquement de l'anticorps secondaire, sont insérées sous forme d'encart. Les données montrées sont représentatives de deux expériences indépendantes (n = 2). Barre d'échelle = 10  $\mu$ m (grossissement 60x)

### **1.2.2 Analyse de l'expression protéique de IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2**

L'analyse de l'expression des récepteurs en Western blot permet d'apprécier l'abondance protéique de manière semi-quantitative. L'expression protéique ne correspond pas nécessairement à l'expression génique obtenue par RT-qPCR notamment en raison de l'existence de nombreux mécanismes de régulation (Vogel & Marcotte, 2012). L'analyse au niveau protéique des différentes sous-unités des récepteurs s'avère dès lors essentielle.

IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 n'ont pu être analysées au niveau protéique. Des anticorps spécifiques des IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 ont été testés mais, malgré le suivi des instructions des fabricants et la répétition des tests, aucune détection des protéines n'a été possible. Ils ont également été testés sous conditions non réductrices, conditions nécessaires pour la révélation de IL-4R $\alpha$ , mais sans résultat.

À l'inverse de IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2, IL-4R $\alpha$  a pu être analysé au niveau protéique, alors que son expression n'avait pu être évaluée en ARNm. L'expression du récepteur IL-4R $\alpha$  a été investiguée sous conditions non réductrices, nécessaires pour son analyse en Western blot (Fig 3-2). Elle est relativement stable au cours du temps et apparaît légèrement augmentée 4h et 24h après déplétion du cholestérol. L'expression observée à 4h de récupération reflète probablement la détection plus faible du contrôle de charge RPL13a, utilisé pour normaliser l'expression d'IL-4R $\alpha$  (Fig 3-2). Le chargement protéique de cette condition fait probablement suite à un problème technique intervenu lors de la réalisation de cette expérience.

L'analyse de l'expression de l'IL-4R $\alpha$  en Western blot a été effectuée lors de trois expériences indépendantes. En l'absence d'un contrôle positif pour l'expression d'IL-4R $\alpha$ , la bande correspondant à l'expression protéique du récepteur a été déterminée à l'aide du marqueur de poids moléculaire.

### **1.3 Effets de la déplétion du cholestérol sur la localisation de IL-4R $\alpha$ dans des kératinocytes**

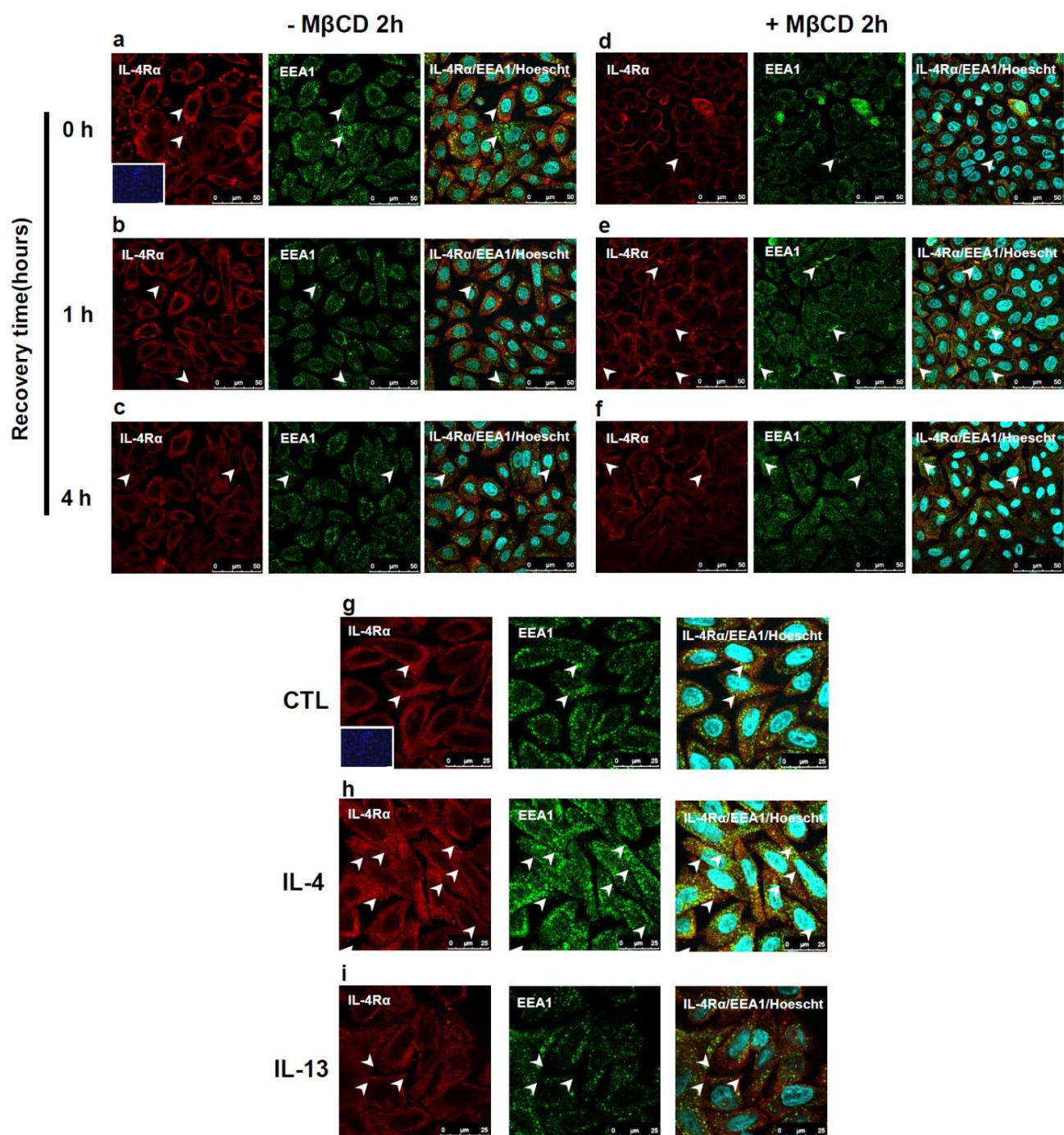
#### **1.3.1 Analyse de la localisation cellulaire de IL-4R $\alpha$ en microscopie à épifluorescence**

Comme l'internalisation de IL-4R $\alpha$  en présence de son ligand a été démontrée dans la littérature (Friedrich et al., 1999; Gandhi et al., 2014; K. Kawakami, Kawakami, Leland, & Puri, 2002), il était intéressant d'examiner si un phénomène similaire d'endocytose de IL-4R $\alpha$  pouvait se produire suite à la déplétion du cholestérol. Nous avons donc examiné sa localisation par détection immunofluorescente (Fig 4). Celle-ci est complémentaire à l'analyse protéique réalisée par Western blot puisqu'elle permet à la fois de fournir une idée qualitative de l'expression protéique mais surtout de renseigner sur la localisation du récepteur au sein de la cellule.

Un immunomarquage sur lamelles couvre-objets supportant les kératinocytes ensemencés a été effectué directement après 2h de traitement en présence de M $\beta$ CD (« temps de récupération 0h »). Pour ce marquage, les cellules ont été perméabilisées afin de rendre accessible le contenu intracellulaire à l'anticorps anti-IL-4R $\alpha$ . Celui-ci est ensuite lié spécifiquement par un anticorps anti IgG de souris couplé à une sonde fluorescente Alexa 488 (vert). Un marquage direct des noyaux a ensuite été réalisé par le Hoechst 33258 (bleu).

Le marquage de IL-4R $\alpha$  apparaît plutôt ponctué avec une localisation principalement périnucléaire et une détection du signal plus intense dans les kératinocytes déplétés en cholestérol par rapport aux cellules non traitées (Fig 4-1). Ce marquage ne corrobore pas les résultats obtenus en Western blot où l'abondance protéique de IL-4R $\alpha$  apparaît être stable





**Figure 4-2 : Localisation de IL-4Rα et de son internalisation au sein d'endosomes porteurs du marqueur EEA1 lors d'une cinétique de récupération dans des kératinocytes déplétés du cholestérol (a-i).**

(a-f) Les kératinocytes arrivés à confluence sont traités ou non pendant 2h en présence de MβCD (7,5 mM) puis laissés récupérer pendant 0h, 1h et 4h. (g-i) Des cultures confluentes ont également été traitées en présence de IL-4 (50 ng/ml) ou IL-13 (50 ng/ml) et servent de référence quant à la détection d'une internalisation du récepteur. (a-i) Les kératinocytes déplétés du cholestérol, stimulés aux interleukines ou laissés non traités sont fixés avec du PFA 4% puis perméabilisés dans du PBS contenant 1% de Triton X-100. Les cellules sont ensuite incubées simultanément avec les anticorps primaires anti-IL-4Rα et anti-EEA1, puis incubées avec les anticorps secondaires anti IgG de souris conjugués à un AlexaFluor568 (IL-4Rα apparaît en rouge ; photo de gauche) ou anti IgG de lapin conjugués à AlexaFluor488 (EEA1 apparaît en vert ; photo du milieu). Les noyaux sont mis en évidence par le Hoechst (bleu). La superposition (photo de droite) permet de mettre en évidence une possible colocalisation entre les marquages d'IL-4Rα et des endosomes porteurs de EEA1. Les micrographies des contrôles négatifs correspondant à l'incubation des cellules en présence uniquement de l'anticorps secondaire, sont insérées sous forme d'encart. Les micrographies ont été prises en microscopie confocale. Les données montrées sont représentatives des résultats de deux expériences dépendantes. Barre d'échelle = 50 μm (a-f) ou 25 μm (g-i).

après déplétion du cholestérol et lors de la phase complète de récupération. Cette discordance pourrait être expliquée par une liaison aspécifique de l'anticorps anti-IL-4R $\alpha$ . Une vérification de la spécificité de l'anti-IL-4R $\alpha$  devrait dès lors être réalisée afin d'améliorer la précision de nos outils et de confirmer éventuellement ces résultats et lever la controverse. Cependant, et indépendamment de la validation de l'anticorps, ces résultats pourraient aussi suggérer une internalisation du récepteur induite par la perturbation des microdomaines lipidiques.

La microscopie à épifluorescence classique ne permettant pas de localiser formellement le récepteur, il convient alors de passer en microscopie confocale. Cette technologie a en effet l'avantage de balayer plan par plan et avec une résolution accrue la cellule et fournir ainsi des indications précises sur la distribution intracytoplasmique du récepteur.

### **1.3.2 Analyse de la localisation cellulaire de IL-4R $\alpha$ en microscopie confocale**

Dans le but de confirmer l'hypothèse d'une internalisation de IL-4R $\alpha$  induite par la perturbation des microdomaines lipidiques, un marquage du récepteur a été réalisé et analysé en microscopie confocale.

Ainsi, les kératinocytes ont été ensemencés sur des lamelles couvre-objet et, arrivés à confluence, ont été incubés pendant 2h en présence de M $\beta$ CD et laissés récupérer ensuite ou non (0h) pendant 1h ou 4h. Pour compléter notre étude, des cultures cellulaires ont également été stimulées avec les IL-4 ou IL-13 afin de montrer l'influence possible de la présence du ligand sur l'internalisation de la chaîne IL-4R $\alpha$  en comparant les niveaux d'internalisation du récepteur après traitement par la M $\beta$ CD ou aux interleukines.

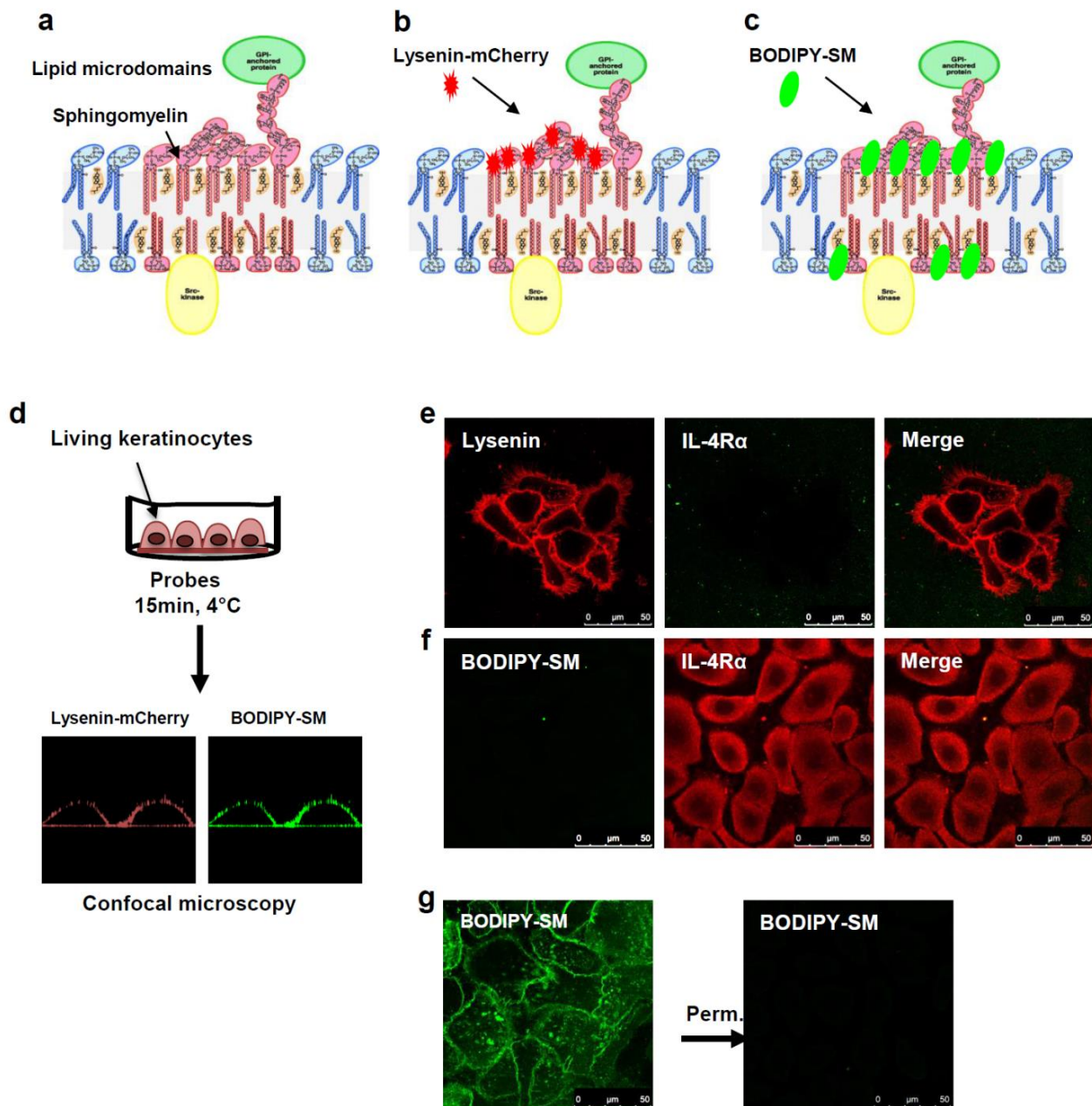
Par ailleurs, une internalisation constitutive du récepteur au sein d'endosomes corticaux de signalisation, type particulier d'endosome porteur entre autre du marqueur EEA1 (Early Endosome Antigen 1) et adossé à la membrane plasmique, a été mise en évidence dans des cellules HEK293T (Gandhi et al., 2014). Il semble alors intéressant de voir si ce type d'internalisation est retrouvé dans nos conditions en visualisant la présence d'une possible colocalisation du récepteur IL-4R $\alpha$  avec le marqueur d'endosome précoce EEA1.

Pour atteindre ces objectifs, un co-immunomarquage des kératinocytes a été réalisé. Les cellules, après avoir été fixées et perméabilisées, sont immuno-marquées avec des anticorps anti-IL-4R $\alpha$  et anti-EEA1, reconnus respectivement par les anticorps secondaires anti IgG de souris conjugué à un Alexa 568 (rouge) et anti IgG de lapin conjugué à un Alexa 488 (vert). Un marquage direct des noyaux par le Hoechst (bleu) est également réalisé.

À l'analyse des plans cellulaires observés au microscope confocal, il apparaît un marquage du récepteur IL-4R $\alpha$  ponctué/granuleux diffus au sein du cytoplasme, confirmant sa localisation intracellulaire. Cette localisation est observée à la fois dans les conditions traitées et non traitées (Fig 4-2 a-i). Un marquage semblable de IL-4R $\alpha$  est retrouvé au niveau de chondrocytes primaires en utilisant le même anticorps (anti-IL-4R $\alpha$  mab230, R&D systems) (Assirelli et al., 2014). Une distribution cytoplasmique a également été montrée pour IL-13R $\alpha$ 2 dans des cellules épithéliales bronchiales (Konstantinidis et al., 2008).

Le marquage de IL-4R $\alpha$ , plutôt périnucléaire en condition contrôle (Fig 4-2 a-c), semble plus prononcé en périphérie cellulaire suite au traitement par la M $\beta$ CD, quel que soit le temps de récupération (0h, 1h ou 4h) (Fig 4-2 d-f) et plus particulièrement directement à la fin du traitement par la M $\beta$ CD (Fig 4-2 d). Le marquage plus marqué suggère une internalisation des récepteurs IL-4R $\alpha$  en réponse à la perturbation des microdomaines lipidiques. L'analyse du marquage de IL-4R $\alpha$  en parallèle avec celui de EEA1 ne montre pas significativement une internalisation du récepteur au sein des vésicules associées au marqueur d'endosome précoce EEA1. En effet, seuls quelques points de colocalisation entre IL-4R $\alpha$  et EEA1 sont observés





**Figure 5 : Localisation du récepteur IL-4Rα au sein des microdomaines lipidiques.** (a-d) Le principe du marquage de la surface des microdomaines lipidiques. (a-c) La sphingomyéline (SM), présente en grande quantité au sein des microdomaines lipidiques, est reconnue par la sonde spécifique fluorescente lysénine-mCherry ou par un analogue fluorescent de la SM, le BODIPY-SM. (d) Les kératinocytes vivants sont incubés dans une solution de lysénine-mCherry ou de BODIPY-SM à 4°C pendant 15 min. La microscopie confocale des membranes planaires correspondant aux membranes plasmiques du côté basal des kératinocytes en culture, est ensuite réalisée pour visualiser les microdomaines lipidiques spécifiques aux SM. (e) Les kératinocytes sont séquentiellement marqués par la lysénine-mCherry (rouge ; photo de gauche) et, après fixation et perméabilisation ou non, par l'anticorps anti- IL-4Rα reconnu par un anticorps secondaire anti IgG de souris conjugué à un AlexaFluor488 (vert ; photo du milieu). La superposition (photo de droite) permet de mettre en évidence une possible colocalisation des deux marquages. (f) De la même manière, la localisation de IL-4Rα dans les microdomaines lipidiques a été testée en marquant les SM par la sonde BODIPY-SM. (g) Des cultures de kératinocytes ont également été mises en présence uniquement de la sonde BODIPY-SM avec ou sans étape de perméabilisation (Perm.) subséquente à l'incubation avec le BODIPY-SM. Les micrographies ont été prises en microscopie confocale. (e) Elles sont représentatives de trois expériences indépendantes pour les co-marquages réalisés avec la sonde lysénine-mCherry et IL-4Rα et (f, g) correspondent à une expérience pour les co-marquages réalisés avec la sonde BODIPY-SM et IL-4Rα. Barre d'échelle = 50 μm.

et il n'y a pas d'augmentation évidente de cette colocalisation au fur et à mesure des temps de récupération après traitement à la M $\beta$ CD et en comparaison aux cellules contrôles (Fig 4-2 a-f).

Dans certaines cellules, davantage fluorescentes après incubation avec la M $\beta$ CD (Fig 4-2 d), EEA1 et IL-4R $\alpha$  présentent des localisations à la fois cytoplasmique et nucléaire. Cette différence de marquage pourrait être due à l'observation d'un plan cellulaire juxtaposé à celui du noyau ou, plus probablement, pourrait être associée à des cellules en apoptose.

Au sein du cytoplasme des cellules stimulées par IL-4 (Fig 4-2 h), la présence de IL-4R $\alpha$  semble plus importante en comparaison aux cellules déplétées du cholestérol, témoignant alors d'une éventuelle augmentation de l'internalisation du récepteur en présence de son ligand. Ce marquage n'est pas comparable à celui retrouvé tant dans les cellules contrôles que dans celles stimulées par IL-13 où l'induction de l'internalisation du récepteur est moins prononcée (Fig 4-2 g, i). Une colocalisation partielle de IL-4R $\alpha$  et EEA1 en présence de IL-4 semble être observée, compte-tenu de la correspondance plus élevée de leurs marquages (Fig 4-2 h). Cette colocalisation reste toutefois à confirmer par des analyses complémentaires de quantification. Si toutefois cette colocalisation se confirmait, elle représenterait seulement une partie du phénomène d'internalisation.

L'ensemble de ces observations fait suite à une seule expérience qui mériterait bien sûr d'être répétée.

L'internalisation de IL-4R $\alpha$  suite à la déplétion du cholestérol pourrait témoigner d'une présence du récepteur au sein des microdomaines lipidiques, à l'instar de ce qui a été observé pour la régulation du EGFR. Celui-ci est internalisé en réponse à la perturbation des microdomaines lipidiques et a été montré y être localisé. Il est dès lors intéressant de déterminer si le récepteur IL-4R $\alpha$  se trouve au sein des microdomaines lipidiques.

#### **1.4 Visualisation des microdomaines lipidiques et de IL-4R $\alpha$**

La visualisation des microdomaines lipidiques dans des kératinocytes vivants est obtenue par le marquage des sphingomyélines (SM) endogènes qui sont, avec le cholestérol, des constituants majeurs des microdomaines lipidiques (Fig 5 a). Les kératinocytes vivants sont incubés en présence d'un fragment non toxique de la lysénine fusionnée avec une protéine fluorescente monomérique rouge mCherry qui se lie spécifiquement aux SM endogènes (Fig 5 b). Après fixation des cellules, un marquage indirect du récepteur IL-4R $\alpha$  est réalisé pour localiser sa présence au sein des microdomaines lipidiques. La visualisation des microdomaines se fait au moyen d'un microscope confocal au niveau de la membrane planaire (Fig 5 d). Ce plan cellulaire est choisi pour éviter la présence des microvillosités des kératinocytes pour lesquelles une accumulation du signal correspondant au marquage des SM peut être observée et risque alors d'interférer avec la mise en évidence des microdomaines lipidiques.

Bien que le marquage des microdomaines lipidiques spécifiques de la SM fonctionne (Fig 5 e ; à gauche et à droite), aucun marquage de IL-4R $\alpha$  n'est observé (Fig 5 e ; milieu et à droite). Cette expérience a été réalisée trois fois dans des cellules perméabilisées ou non perméabilisées. L'ensemble des paramètres sont identiques à ceux utilisés lors des marquages du récepteur réalisés précédemment sur cellules fixées et perméabilisées (Fig 4-1) excepté la présence des sondes fluorescentes lysénine-mCherry qui se lient spécifiquement au niveau des SM endogènes. Il semblerait donc que ce type de sonde fluorescente pourrait affecter la liaison de l'anticorps anti-IL-4R $\alpha$ . La reconnaissance du récepteur par l'anti-IL-4R $\alpha$  est relativement sensible comme illustré par la nécessité de conditions non réductrices pour la



détection du récepteur par l'anticorps en western blot. De plus, le marquage direct des SM endogènes par les sondes lysénine-mCherry pourrait entrainer le blocage de ces lipides, ce qui peut être relativement traumatisant pour les cellules et expliquer en partie l'absence de marquage du récepteur IL-4R $\alpha$ .

Afin de pallier à cette absence de co-marquage, il a été décidé d'utiliser un autre type de sonde que la lysénine-mCherry, le fluorophore BODIPY couplé à un SM exogène (BODIPY-SM). Le BODIPY-SM s'insère de manière préférentielle où se localisent les SM endogènes et se concentre davantage dans des régions enrichies en SM (Fig 5 c). Cette concentration de BODIPY-SM permet alors de visualiser les microdomaines spécifiques aux SM.

Les résultats du co-marquage de IL-4R $\alpha$  et des microdomaines lipidiques à l'aide des sondes BODIPY-SM montrent la présence du marquage du récepteur IL-4R $\alpha$ , ponctué et cytoplasmique (Fig 5 f ; milieu et à droite), alors que le marquage des microdomaines lipidiques n'apparaît pas (Fig 5 f ; à gauche et à droite). L'absence de la visualisation des microdomaines lipidiques peut s'expliquer par des facteurs d'ordre technique.

En effet, le marquage des microdomaines lipidiques riches en SM par les sondes BODIPY-SM semble être affecté par l'étape de perméabilisation. Après incubation en présence des sondes BODIPY-SM et fixation des cellules uniquement, les microdomaines lipidiques sont mis en évidence au niveau de la membrane planaire en microscopie confocale (Fig 5 g ; à gauche). Si une étape de perméabilisation est ajoutée, ce marquage des microdomaines lipidiques disparaît (Fig 5 g ; à droite). Le marquage à l'aide des BODIPY-SM résiste donc à la fixation mais non à l'étape de perméabilisation.

Cette expérience nécessite donc encore des ajustements concernant le marquage des microdomaines lipidiques et celui de IL-4R $\alpha$ .

L'étude du récepteur IL-4R $\alpha$  en monocouches montre, sur base des différents résultats récoltés, que son expression ne semble pas être altérée en réponse à la déplétion du cholestérol (Fig 3-2 a), alors que son internalisation semble plus marquée suite à la perturbation des microdomaines lipidiques (Fig 4-2 d-f). L'absence de l'augmentation de l'expression de IL-4R $\alpha$  ne reflète pas nécessairement une absence d'activation du récepteur, et cette activation potentielle pourrait être associée à son internalisation induite en réponse à la déplétion du cholestérol. Ce processus a été rapporté pour la régulation de EGFR, pour lequel la déplétion du cholestérol induit sa dimérisation, sa phosphorylation et son internalisation, sans pour autant altérer son expression dans les kératinocytes humains (Lambert et al., 2008; Lambert et al., 2006; X. Q. Wang & Paller, 2006).

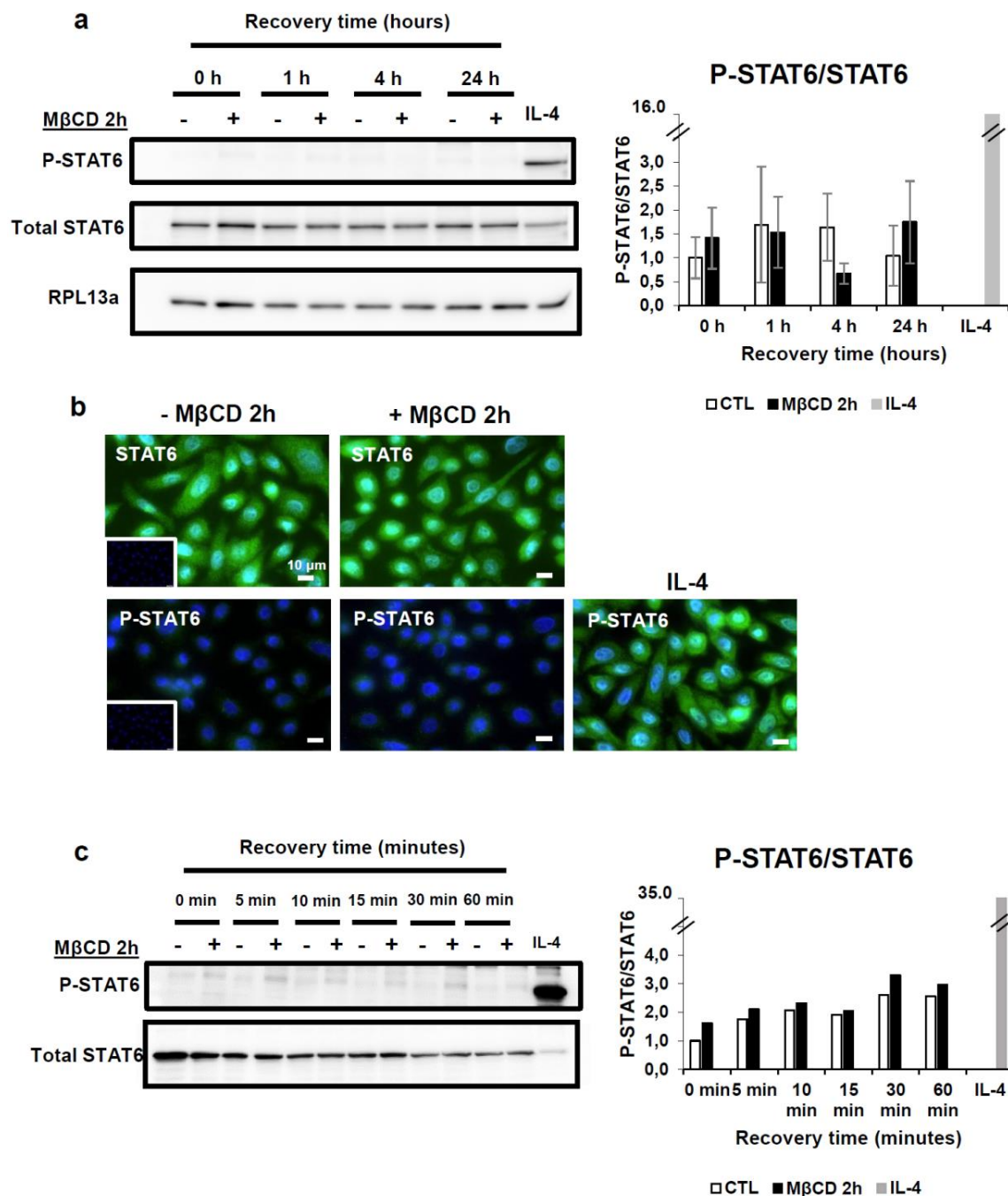
## **1.5 Effets de la déplétion du cholestérol sur la signalisation des récepteurs aux IL-4 et IL-13**

### **1.5.1 Analyse de la signalisation de la voie JAK-STAT6**

Pour mettre en évidence une éventuelle activation du récepteur induite en réponse à la déplétion du cholestérol, nous nous sommes concentrés sur la phosphorylation de STAT6(Tyr641) (Fig 6), un intermédiaire de la voie JAK-STAT6 qui a été largement rapportée dans la littérature comme étant un acteur majeur de la signalisation des IL-4 et IL-13.

#### **Analyse de la phosphorylation de STAT6 en Western blot :**

Après 2h de traitement des kératinocytes confluents avec la M $\beta$ CD et pour les différents temps de récupération (0h, 1h et 4h), aucune phosphorylation significative de STAT6 n'est observée, contrairement à 2h de stimulation avec IL-4 où la phosphorylation de STAT6 est



**Figure 6 : Analyse de la phosphorylation de STAT6 après déplétion du cholestérol en Western blot (a, c) et en immunofluorescence (b).** Les kératinocytes sont incubés ou non pendant 2h en présence de MβCD (7,5 mM) avant récupérer pour différentes périodes de récupération. Des cultures ont également été traitées 2h avec de IL-4 (50 ng/ml) et servent de contrôles positifs pour la phosphorylation de STAT6 (a-c). (a, c) Des extraits protéiques sont analysés par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques reconnaissant la forme totale de STAT6 ou la forme phosphorylée (P-STAT6 (Tyr641)). Les bandes spécifiques aux formes phosphorylées de STAT6 sont quantifiées et analysées au cours du temps après incubation ou non avec la MβCD. Les résultats sont normalisés par rapport aux signaux protéiques de la forme totale de STAT6 utilisé, (a) avec la détection de la protéine ribosomale RPL13a, comme contrôle de charge. (a) Chaque donnée reportée dans le graphe représente la moyenne  $\pm$  la SD relative de trois expériences indépendantes. Les données ont été soumises à un test statistique de type ANOVA2 *repeated measures* ( $n = 3$ ). (c) Les données sont représentatives d'une expérience. (b) Les cellules déplétées ou non du cholestérol sont fixées directement à la fin du traitement, perméabilisées avec du méthanol 100% et ensuite incubées avec les anticorps primaires dirigés contre STAT6 (photos supérieures) et P-STAT6 (photos inférieures), suivi par des anticorps secondaires anti IgG de souris conjugués à AlexaFluor488 (vert). Les noyaux sont marqués avec le Hoechst (bleu). Les images des contrôles négatifs correspondant en l'incubation des cellules en présence uniquement de l'anticorps secondaire sont insérées sous forme d'encarts. Les micrographies réalisées en microscopie à épifluorescence sont représentatives de deux expériences indépendantes. Barre d'échelle = 10  $\mu$ m (grossissement 60x).

clairement visible, signifiant alors une activation du récepteur IL-4R $\alpha$  (Fig 6 a). Cette stimulation des kératinocytes par IL-4 est utilisée comme contrôle positif pour l'induction de la phosphorylation de STAT6. Ceci a été réalisé sur des kératinocytes en monocouches produites et analysées en trois expériences indépendantes.

#### **Analyse de la phosphorylation de STAT6 en immunofluorescence :**

Pour compléter et conforter les résultats obtenus en Western blot, STAT6 et sa forme phosphorylée ont été analysés en immunofluorescence. La forme totale de STAT6 est trouvée être présente dans le noyau et à travers le cytoplasme (Fig 6 b ; supérieur) ce qui est cohérent avec les données de la littérature où une migration continue de STAT6 dans le noyau indépendamment de sa phosphorylation est rapportée (H. C. Chen & Reich, 2010). Il n'y a pas de différences claires entre les conditions traitées avec la M $\beta$ CD et non-traitées (Fig 6 b ; inférieur). D'autre part, la forme phosphorylée de STAT6 est presque indétectable, reflétant l'absence de phosphorylation de STAT6 constatée à travers les résultats de Western Blot.

Suite à la stimulation par IL-4, P-STAT6 est trouvé à la fois avec des localisations cytoplasmique et nucléaire où il s'accumule et joue son rôle de facteur de transcription (Kelly-Welch et al., 2003) (Fig 6 b ; supérieur). En comparaison avec les cellules stimulées par IL-4 pendant 2h, les signaux d'immunofluorescence de P-STAT6 sont plus faibles dans les cellules traitées à la M $\beta$ CD et non-traitées. La déplétion en cholestérol ne semble donc pas activer la signalisation cellulaire dépendante de STAT6.

#### **Analyse de la phosphorylation de STAT6 pour des temps intermédiaires de récupération :**

Les timings appliqués dans notre procédure peuvent cependant cacher une détection pertinente de la phosphorylation de STAT6. Dans une étude portée sur des kératinocytes murins, la régulation de la phosphorylation de STAT6 apparaît se faire plus rapidement (Omori-Miyake et al., 2014). Des temps intermédiaires entre 0h et 1h de récupération ont alors été analysés afin de détecter une éventuelle activation de la voie STAT6 suite à la perturbation des microdomaines lipidiques. Une légère phosphorylation de STAT6 semble se produire dès les 5 premières minutes de récupération et augmenter après 30 minutes de récupération (Fig 6 c). Cette phosphorylation semble néanmoins mineure par rapport à la phosphorylation induite par la stimulation des kératinocytes avec IL-4 (Fig 6 c). Ce profil de phosphorylation suggère toutefois qu'en réponse au stress cellulaire induit par la déplétion du cholestérol, STAT6 pourrait être rapidement activé. L'analyse de la phosphorylation de STAT6 au cours de ces temps intermédiaires a été réalisée une fois et nécessite d'être répétée pour confirmer les résultats.

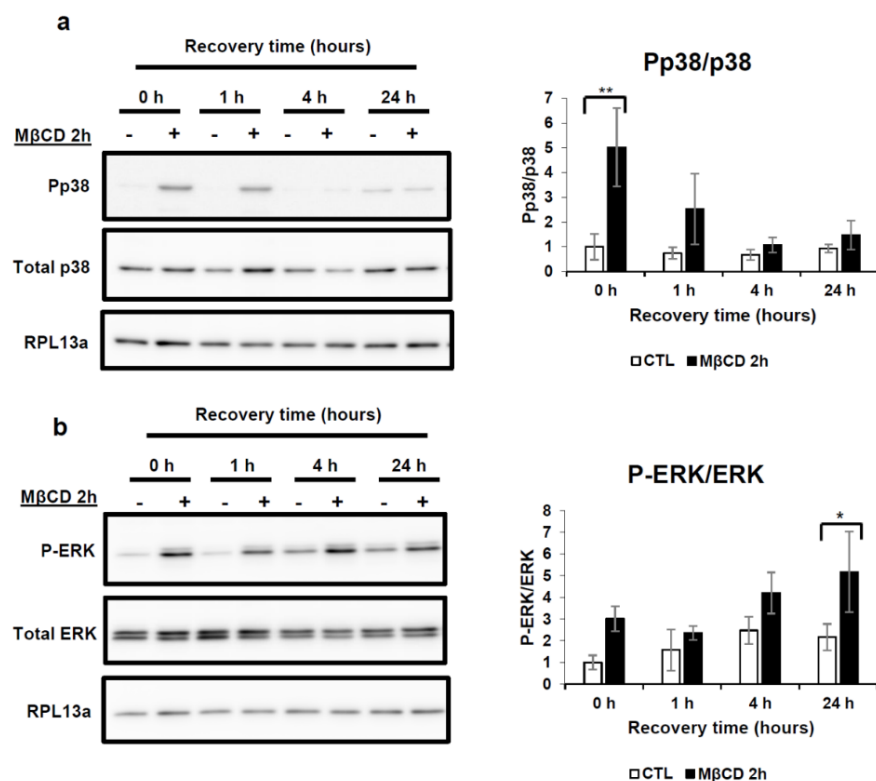
La phosphorylation de STAT6 n'ayant pas été clairement démontrée, bien que rapportée comme étant une caractéristique de l'activation de l'IL-4R (Omori-Miyake et al., 2014; Schindler et al., 2007), elle ne signifie pas pour autant une absence d'activation du récepteur IL-4R. D'autres voies de signalisation impliquant les MAPK ERK1/2 et p38 ont été montrées être déclenchées suite à l'activation du récepteur IL-4R (Omori, Kelly-welch, David 2001). Il est alors intéressant d'étudier ces autres intermédiaires de la transduction du signal associés à IL-4R.

#### **1.5.2 Analyse de la signalisation des voies des MAPKs p38 et ERK1/2**

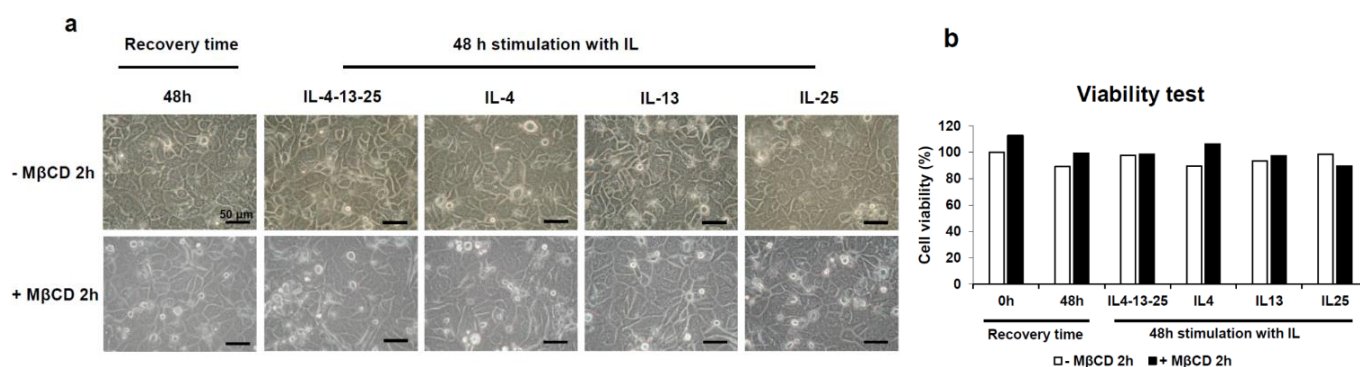
L'activation de la signalisation cellulaire associée aux MAPK p38 et ERK1/2 est investiguée au cours du temps (0h, 1h, 4h et 24h) après déplétion du cholestérol. Cette investigation porte sur trois expériences indépendantes (Fig 7).

La phosphorylation des sérine/thréonine MAPK p38(Thr180/Tyr182) chez des kératinocytes déplétés en cholestérol est significativement élevée directement après les 2h d'incubation en





**Figure 7 : Analyse de la phosphorylation des MAPKs p38 (a) et ERK1/2 (b) dans des kératinocytes déplétés du cholestérol.** (a, b) Les kératinocytes confluents sont incubés ou non pendant 2h en présence de MβCD (7,5 mM) avant d'être mis en culture dans du milieu frais pour différentes périodes de récupération (0h, 1h, 4h et 24h). Les extraits protéiques sont analysés par analyse Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes totales de p38 et ERK1/2 ainsi que les formes phosphorylées Pp38 et P-ERK1/2. Les bandes spécifiques aux formes phosphorylées de p38 et ERK sont quantifiées et analysées au cours du temps après incubation ou non avec la MβCD. Les résultats sont normalisés par rapport aux signaux protéiques des formes totales p38 et ERK1/2 utilisés, avec la détection de la protéine ribosomale RPL13a, comme contrôle de charge. Chaque donnée reportée dans le graphe représente la moyenne  $\pm$  SD relative de trois expériences indépendantes. Les données ont été soumises à un test statistique de type ANOVA2 *repeated measures* (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ;  $n = 3$ ).



**Figure 8 : Analyse de la morphologique (a) et de la viabilité (b) cellulaires après stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 de kératinocytes à confluence préalablement ou non déplétés du cholestérol.** (a-b) Les cellules confluents sont incubées pendant 48h en présence des IL-4 (50 ng/ml), IL-13 (50 ng/ml), IL-25 (20 ng/ml) et ce, de manière combinée ou séparée après déplétion ou non du cholestérol (2h de traitement avec la MβCD (7,5 mM)). Des cultures cellulaires confluents ont également été laissées sans traitement et exploitées 48h après confluence ou uniquement déplétées du cholestérol et laissées récupérer ensuite 48h dans du milieu frais. (a) La morphologie cellulaire est évaluée en utilisant un microscope à contraste de phase. Chaque micrographie est représentative de trois expériences indépendantes. Barre d'échelle = 50  $\mu$ m (grossissement 40x). (b) La viabilité cellulaire des cultures soumises aux interleukines et/ou à la MβCD est évaluée par test MTT. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (confluence + 48h) considérées comme représentant 100% de la viabilité cellulaire. Cette expérience a été réalisée une fois.

présence de la M $\beta$ CD. Cette activation décroît progressivement au cours des temps de récupération (Fig 7 a). En ce qui concerne la signalisation associée à la sérine/thréonine kinase ERK1/2(Thr202/Tyr204), son analyse montre une phosphorylation immédiate de ERK1/2 après la déplétion du cholestérol. ERK1/2 reste dans son état activé durant la phase de récupération complète pour atteindre une activation significativement élevée à 24h de récupération (Fig 7 b). L'ensemble de ces résultats rappelle l'activation des MAPK p38 et ERK1/2 détectée après 1h de traitement par la M $\beta$ CD dans des kératinocytes en monocouches et apporte une confirmation supplémentaire quant à la validation de notre traitement de 2h de M $\beta$ CD en absence d'HC.

Cependant, les MAPKs sont impliquées dans de nombreux processus biologiques (différenciation, survie, métabolisme...) (Roux, 2004) et plus particulièrement dans la réponse cellulaire associée à la déplétion du cholestérol (Giltaire et al., 2011; Jans et al., 2004; Lambert et al., 2008). La phosphorylation de ERK1/2 en réponse à la déplétion du cholestérol a été montrée être associée à l'activation de EGFR (Jans et al., 2004; Lambert et al., 2008). Ainsi, sur base de ces résultats, aucune conclusion ne peut être tirée quant à la relation directe entre cette activation de MAPK p38 et ERK1/2 et celle de IL-4R. Il serait alors intéressant d'analyser la phosphorylation de ces MAPK dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques tout en y associant ou non un inhibiteur de IL-4R.

À ce stade de notre étude, le schéma de traitement des kératinocytes en monocouches a été adapté de manière à reproduire la même procédure que celle appliquée en RHE. Ce nouveau schéma de traitement consiste à « activer » les kératinocytes cultivés en monocouches par stimulation pendant 48h aux IL-4, IL-13 et IL-25 précédée ou non de 2h de traitement par la M $\beta$ CD et ce dans un milieu de culture sans HC. Le choix d'incorporer l'IL-25 dans ce schéma de traitement fait suite à sa présence dans le modèle en RHE.

## **2 Déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 dans un modèle de kératinocytes en monocouches**

### **2.1 Transposition de la déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 du modèle en RHE aux cultures de kératinocytes en monocouches**

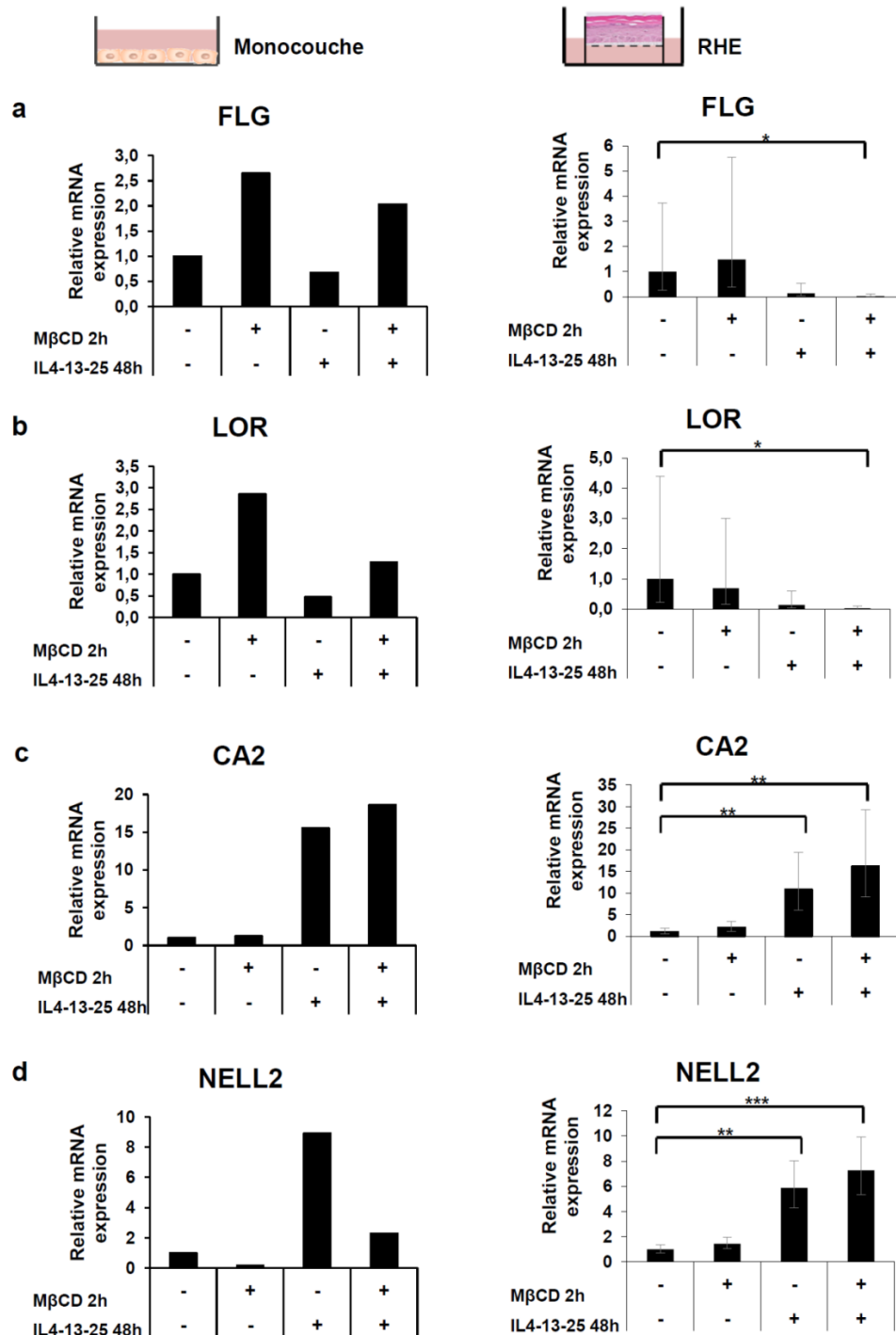
#### **2.1.1 Analyse de la morphologie et de la viabilité cellulaires**

Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier l'absence de cytotoxicité des traitements appliqués sur les kératinocytes en monocouches. Une analyse de la morphologie cellulaire et un test de viabilité cellulaire ont été réalisés à la suite de 48h de stimulation aux interleukines IL-4, IL-13, IL-25 séparées ou combinées. Ces stimulations sont précédées ou non par 2h de traitement avec la M $\beta$ CD. Des cultures cellulaires ont également été incubées pendant 2h en présence de la M $\beta$ CD et laissées ensuite récupérer pour une période de 48h. Quelles que soient les conditions, aucune altération tant de la morphologie (Fig 8 a) que de la viabilité cellulaires n'a été observée (Fig 8 b). Le choix d'analyser les interleukines séparées devait permettre de détecter l'origine de la cytotoxicité qui aurait pu être associée à leur combinaison.

#### **2.1.2 Analyse de l'expression en ARNm de gènes marqueurs de DA**

Pour poursuivre la validation du modèle en monocouches, l'expression de gènes témoins de l'effet synergique ou additif associé à la combinaison du traitement à la M $\beta$ CD et de la stimulation aux interleukines IL-4, IL-13 et IL-25 a été étudiée. Les gènes concernés par cette





**Figure 9 : Analyse de l'expression relative en ARNm de gènes marqueurs de la DA dans des kératinocytes déplétés du cholestérol et/ou stimulés par les interleukines (a-d). (a-d ; colonne de gauche)** Les cultures cellulaires arrivées à confluence sont incubées en présence de MβCD durant 2h et/ou stimulées par un mélange d'interleukines IL-4 (50 ng/ml), IL-13 (50 ng/ml) et IL-25 (20 ng/ml) pendant 48h. Des cultures cellulaires n'ont également été soumises à aucun traitement et sont exploitées 48h après confluence. L'ARN total est extrait de chaque culture, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR pour l'expression de la filaggrine FLG (a), loricrine LOR (b), CA2 (c) et NELL2 (d). Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. Les résultats indiqués correspondent aux résultats de l'une des deux expériences indépendantes réalisées. **(a-d ; colonne de droite)** Les expressions en ARNm de la FLG, LOR, CA2 et NELL observées en RHE arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction et traités selon les mêmes conditions (De Vuyst, en préparation), servent de point de comparaison pour les expressions observées dans le modèle de kératinocytes en monocouches afin de valider la transposition des conditions de traitements des RHE en monocouches.

analyse sont la filaggrine, loricrine, CA2 et NELL2. Une diminution de l'expression de la filaggrine et loricrine ainsi qu'une augmentation de l'expression de CA2 et NELL2 sont retrouvées dans l'épiderme de patients atteints de DA. Le profil transcriptionnel de ces gènes varie de la même manière lorsque les RHE, arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de leur reconstruction, sont stimulés pendant 48h par les IL-4, IL-13, IL-25. Lorsque cette stimulation est précédée de la déplétion du cholestérol membranaire des épidermes, les variations d'expression de ces gènes sont exacerbées et deviennent significatives, voire plus significatives (Fig 9 ; colonne de droite). Il est dès lors important de pouvoir vérifier si le profil d'expression de la filaggrine, loricrine, CA2 et NELL2 tel que montré dans les RHE est retrouvé dans les monocouches. En effet, notre travail repose sur l'observation de l'effet potentiellement synergique de la combinaison des traitements dans les RHE et a pour but à comprendre ce phénomène à travers l'étude des récepteurs aux interleukines.

L'analyse de l'expression de ces gènes marqueurs de la DA a été réalisée (Fig 9 ; colonne de gauche) au cours de deux expériences indépendantes et montrent des résultats comparables. Cependant, lors de la première expérience, la condition « traitement par la MβCD avec 48h de récupération » n'a pu être réalisée. Malgré la non répétition de cette condition, notre attention s'est portée sur l'analyse des cellules stimulées avec les interleukines, préalablement ou non déplétées du cholestérol. Ces deux conditions de traitement sont en effet critiques dans la compréhension de la synergie observée dans le modèle des RHE.

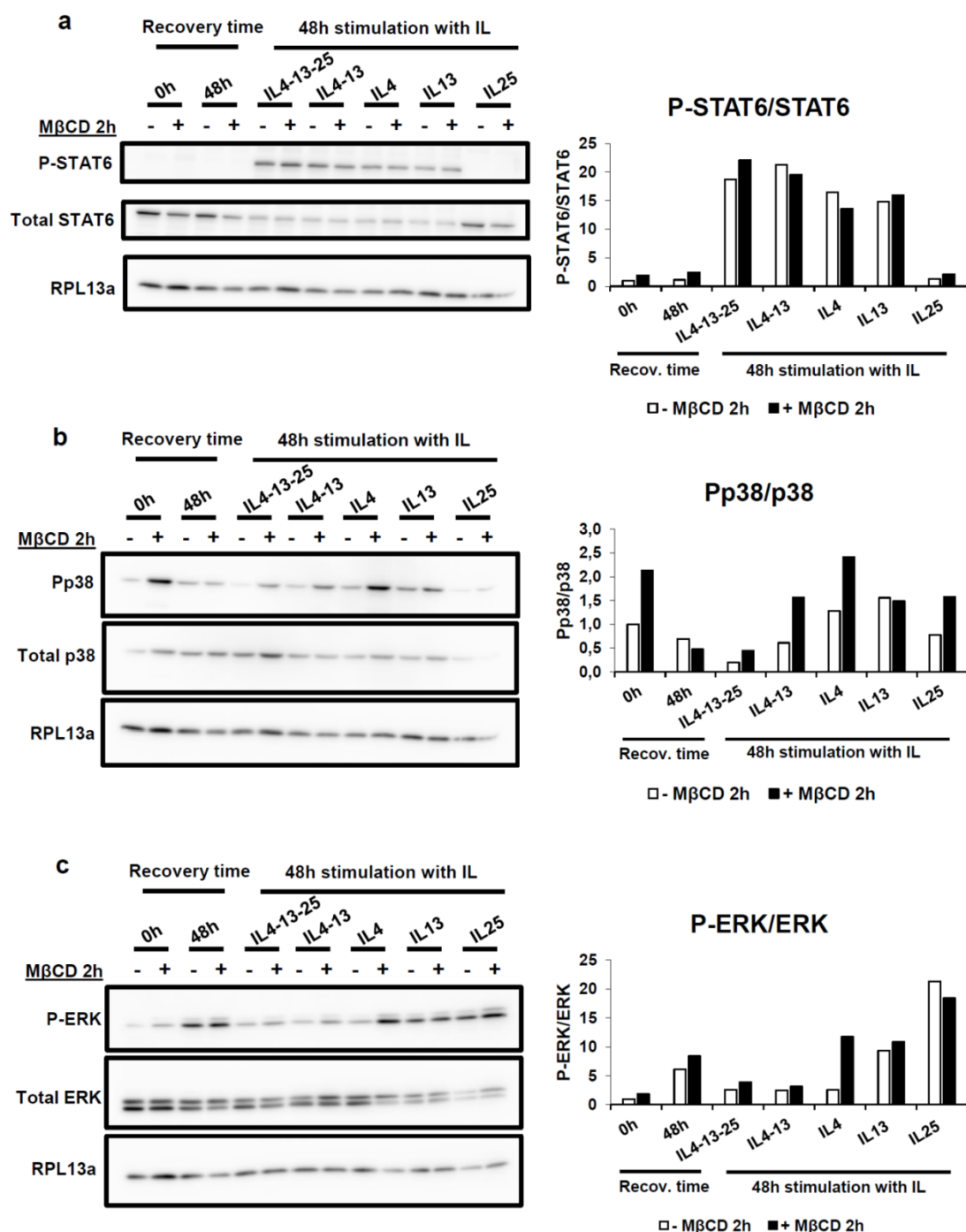
Le traitement aux interleukines seules, sans incubation préalable en présence de la MβCD, est retrouvé induire des effets comparables à ceux observés dans les RHE sur l'expression des gènes d'intérêt (Fig 9 a-d). La combinaison des traitements entraîne une augmentation de l'expression de la filaggrine et de la loricrine à l'inverse de ce qui est observé avec les interleukines seules (Fig 9 a, b). En ce qui concerne les gènes NELL2 et CA2, l'augmentation de leur expression, comparée à celle retrouvée avec les interleukines seules, se révèle antinomiques (Fig 9 c, d). En effet, si la régulation de CA2 suit le même profil d'expression que celui retrouvé dans le modèle en RHE (Fig 9 c), celui de NELL2 s'avère augmenter de manière moindre que dans le cas du traitement avec uniquement les interleukines (Fig 9 d).

Hormis pour CA2, ces données ne corroborent pas ce qui a été observé dans les RHE où la combinaison des traitements est responsable d'une intensification des effets induits par les interleukines non précédées d'un traitement avec la MβCD. Ce manque de corrélation pourrait être imputé à l'action de la MβCD. Le traitement de 2h avec la MβCD suivi d'une période de récupération de 48h semble entraîner des effets sur la régulation de l'expression des gènes opposés à ceux associés aux interleukines (Fig 9 a, b, d).

La perte de l'effet potentiellement synergique de la combinaison de la déplétion du cholestérol et stimulation par IL-4, IL-13, IL-25 observée en monocouches (Fig 9 a-d) ainsi que le manque de reproductibilité de l'expression de TSLP (Fig 2 c) précédemment montré, représentent des limitations à l'utilisation du modèle en monocouches pour notre hypothèse de travail.

## **2.2 Effets de la stimulation aux IL-4, IL-13 et IL-25 en condition de déplétion du cholestérol sur la signalisation cellulaire : Quelques pistes**

Malgré ces limitations, des pistes intéressantes concernant la signalisation associée aux interleukines chez des kératinocytes déplétés ou non du cholestérol membranaire sont relevées après analyse de la voie JAK-STAT6 et des MAPK p38 et ERK1/2. Néanmoins, cette expérience n'ayant été produite qu'une seule fois, aucune conclusion ne peut en être tirée avec certitude.



**Figure 10 : Analyse de la phosphorylation de STAT6 (a) et des MAPKs p38 (b) et ERK1/2 (c) dans des kératinocytes déplétés du cholestérol et/ou stimulés par les interleukines seules ou combinées. (a-c)** Les cultures cellulaires arrivées à confluence sont incubées en présence de MβCD durant 2h et/ou stimulées par les IL-4, IL-13 et IL-25 combinées ou séparées pendant 48h. Des cultures cellulaires n'ont également été soumises à aucun traitement et sont exploitées 48h après confluence. Les extraits protéiques sont analysés par analyse Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes totales de STAT6, p38 et ERK1/2 ainsi que les formes phosphorylées P-STAT6 (Tyr641), Pp38 et P-ERK1/2. Les bandes spécifiques aux formes phosphorylées de STAT6, p38 et ERK1/2 sont quantifiées et analysés au cours du temps de récupération/stimulation après incubation ou non avec la MβCD et stimulation ou non avec les interleukines. Les résultats sont normalisés par rapport aux bandes protéiques des formes totales STAT6, p38 et ERK1/2, utilisés, avec la détection de RPL13a, comme contrôle de charge. Cette expérience a été réalisée une fois.

Des kératinocytes en monocouches sont soumis soit à un traitement de 2h avec la M $\beta$ CD suivie ou non (0h) d'une période de récupération (48h), soit à une stimulation de 48h par les IL-4, IL-13, IL-25 combinées ou séparées, soit à la combinaison de ces deux traitements.

### **2.2.1 Analyse de la signalisation de la voie JAK-STAT6**

L'analyse de la phosphorylation de STAT6(Tyr641), intermédiaire de la transduction du signal essentiel dans la propagation de la réponse de IL-4R, a révélé trois éléments principaux (Fig 10 a). Les IL-4 et IL-13 seules ou combinées entraînent l'activation de la voie de transduction du signal JAK-STAT6, confirmant les données de la littérature. La signalisation associée à IL-25 ne passerait pas par STAT6 comme le laisse transparaître l'absence de détection de P-STAT6 en Western blot. Enfin, il n'y a pas de différences observées, que ce soit dans le cas où les kératinocytes sont préalablement déplétés du cholestérol, ou non.

D'un point de vue technique, la plus faible révélation de la forme totale de STAT6 pour certaines conditions vient peut-être du fait d'une surexposition des bandes correspondantes lors de la détection antérieure de P-STAT6.

### **2.2.2 Analyse de la signalisation des voies des MAPKs p38 et ERK1/2**

L'évaluation de la phosphorylation des sérine/thréonine kinases p38(Thr180/Tyr182) révèle que la déplétion du cholestérol membranaire suivie de la stimulation par IL-4 augmente l'activation de p38 (Fig 10 b). Ce résultat révèle un élément intéressant et pourrait constituer une piste d'investigation future.

Une activation de la MAPK p38 est observée directement à la fin du traitement de 2h avec la M $\beta$ CD comme montrée dans la section précédente « monocouche et déplétion du cholestérol » (Fig 7 a) et cette activation est réduite à 48h de récupération (Fig 10 b).

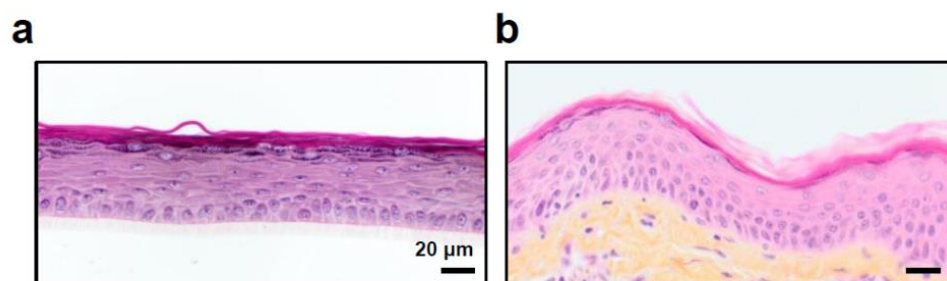
Concernant l'analyse de la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase ERK1/2(Thr202/Tyr204), elle est augmentée dans les kératinocytes déplétés du cholestérol après 48h de récupération ou après 48h de stimulation avec les IL-4, 13 ou 25 (Fig 10 c). Le fait d'activer les kératinocytes par traitement à la M $\beta$ CD avant de les stimuler par IL-4 semble favoriser davantage l'activation de ERK1/2 en comparaison à la seule stimulation par IL-4 (Fig 10 c). Sur base de l'analyse relative au contrôle de charge RPL13a, la quantité en protéines pour ces conditions semble plus faible en comparaison des autres puits (Fig 10 c).

La différenciation serait en partie responsable de l'activation des kinases ERK1/2 pour les conditions « traitement aux IL-4, IL-13 et IL-25 séparées » au vu de la présence de leur phosphorylation dans les cultures contrôles à 48h (confluence J+2) versus à 0h (confluence J0) (Fig 10 c). De manière intéressante, il semble que la combinaison des interleukines ait un effet négatif sur cette activation alors que les interleukines seules semblent moins l'affecter.

L'étude de la signalisation par Western blot montre que la stimulation par IL-4 précédée de la déplétion du cholestérol et les voies des MAPK p38 et ERK1/2 pourraient être des caractéristiques intéressantes à analyser ultérieurement dans un modèle d'épiderme reconstruit.

Le choix de travailler sur le modèle de kératinocytes en monocouches était motivé, indépendamment de raisons pratiques, par l'intérêt d'étudier la régulation des récepteurs dans un modèle plus simple. Néanmoins, la perte de la complexité des interactions cellulaires retrouvée au sein d'un épiderme risque de diluer potentiellement la mise en évidence de l'effet analysé.

Bien que la décision d'étudier la régulation de IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 dans un modèle de monocouches était légitime, il s'est avéré que ce modèle ne constitue pas un outil



**Figure 11 : Analyse de la morphologie d'un épiderme humain *in vitro* (a) et *in vivo* (b).** Une coloration HE et HES est réalisée respectivement sur un RHE arrivé au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction et un échantillon de peau normale. Barre d'échelle = 20 µm (grossissement 20x).

pertinent pour l'étude de la régulation des récepteurs aux interleukines IL-4 et IL-13 dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques. Les réponses cellulaires induites par les traitements sur des kératinocytes confluents ne corroborent pas ce qui était observé dans un modèle plus complexe d'épiderme reconstruit. En conséquence, il convient alors d'utiliser les épidermes reconstruits en vue d'élucider la régulation de IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 tant au niveau de leur expression que de leur signalisation. Il s'agit d'un outil plus sophistiqué et représentatif de l'épiderme humain *in vivo* en termes d'architecture tissulaire, de différenciation et de fonction de barrière. L'épiderme en trois dimensions est constitué des différentes couches caractéristiques de l'épiderme *in vivo*, à savoir, les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée, résultant de la différenciation complète des kératinocytes. Si la compréhension d'un phénomène observé au sein des RHE à l'aide de monocouches ne paraît pas adéquate, les monocouches représentent toutefois un outil d'étude approprié de l'éventuelle localisation des récepteurs au sein des microdomaines lipidiques et de leur internalisation puisque ces analyses sont plus difficilement réalisables dans un tissu.

## **B. Étude de la régulation des récepteurs dans un modèle d'épiderme humain reconstruit**

Les RHE sont obtenus après ensemencement de kératinocytes sur des filtres en polycarbonate à raison de 250 000 cellules par cm<sup>2</sup> (minimum) et placés, le lendemain, à l'interface air-liquide. Cette étape permet la reconstruction de l'épiderme en conditions non immergées, nécessaires à la différenciation complète des kératinocytes et ainsi à la formation d'une couche cornée. Les épidermes *in vitro* arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont constitués des quatre couches représentatives d'un épiderme humain normal *in vivo*. Dès lors, dans le cadre de notre étude, les différents traitements sont appliqués sur les RHE reconstruits pendant 11 jours.

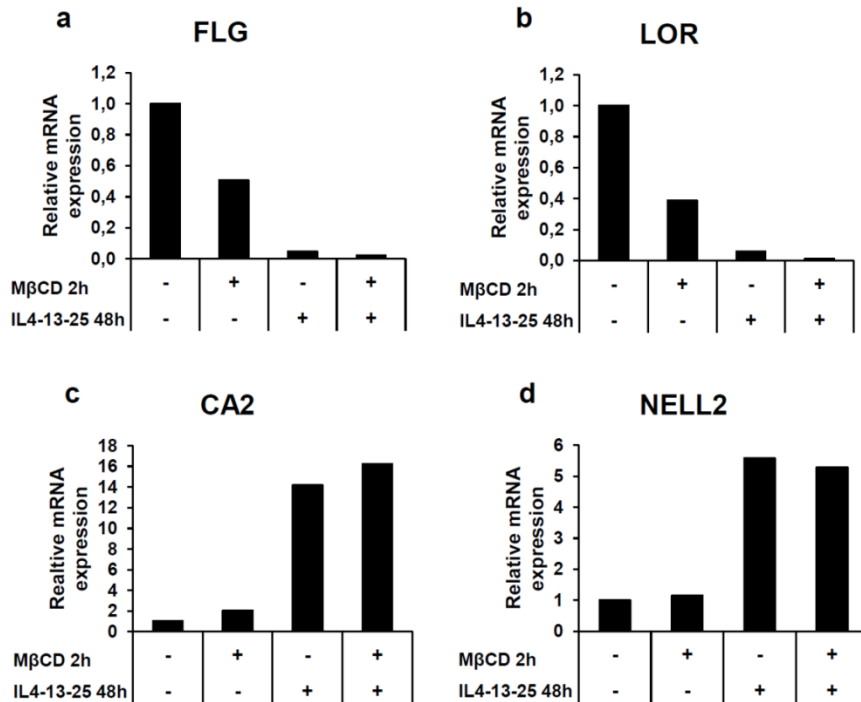
D'un point de vue technique, la souche de kératinocytes employée a été avant tout validée par analyse histologique du RHE, à l'aide d'une coloration HE. Cette coloration permet de mettre en évidence la morphologie des épidermes reconstruits. L'hémalum colore les noyaux en bleu alors que l'érythrosine colore le cytoplasme en rose-rouge (Fig 11). Au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction, l'épiderme obtenu *in vitro* (Fig 11 a) apparaît morphologiquement équivalent à un épiderme humain normal *in vivo* (Fig 11 b).

### **1 Déplétion du cholestérol et stimulation aux IL4-13-25**

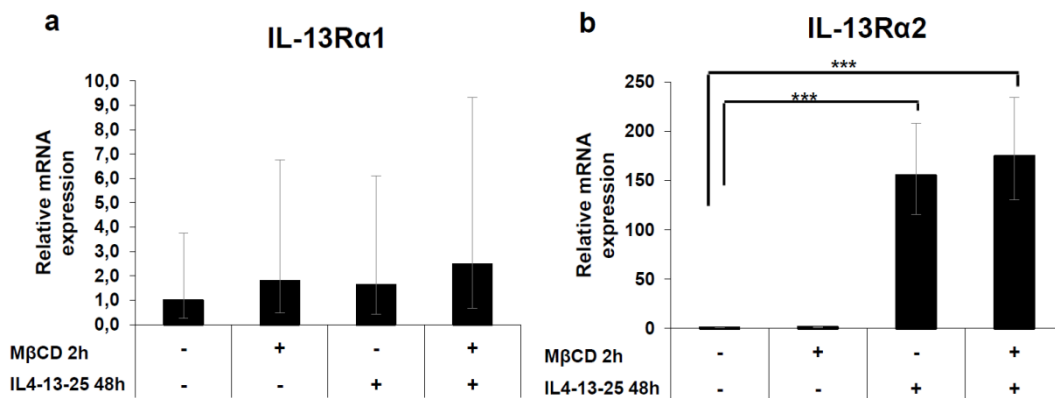
Les épidermes reconstruits sont stimulés en présence d'un cocktail d'interleukines IL-4, IL-13, IL-25 pour une durée de 48h. Cette stimulation est, ou non, précédée d'un traitement de 2h avec la M $\beta$ CD.

Ces traitements suivent la même procédure que celle appliquée lorsque l'effet synergique a été observé (De Vuyst, en préparation). D'autres épidermes soumis à 2h d'incubation en présence de M $\beta$ CD, suivie d'une période de récupération de 48h, permettent de mettre en évidence l'implication éventuelle de la déplétion du cholestérol membranaire sur la stimulation subséquente aux interleukines. Des RHE non traités et arrêtés à leur 13<sup>ème</sup> jour (J11 + 48h) de reconstruction servent de contrôles. Pour l'ensemble de ces conditions, les épidermes reconstruits sont dans un milieu de culture sans HC.

Cette procédure a pour but de visualiser l'effet du traitement aux interleukines respectivement en l'absence et en présence d'une déplétion préalable du cholestérol sur la régulation des récepteurs aux IL-4 et -13.



**Figure 12 : Analyse de l'expression relative en ARNm des gènes marqueurs de la DA dans des épidermes reconstruits après déplétion du cholestérol et/ou stimulation aux interleukines pendant 48 h.** (a-d) Les RHE obtenus au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont incubés 2h en présence de MβCD et ensuite placés dans du milieu de culture frais pendant 48h ou sont incubés en présence des IL-4, IL-13 et IL-25 pendant 48h. Des RHE à J11 stimulés par la combinaison de ces deux traitements ou soumis à aucun traitement et exploités 48h plus tard. L'ARN total est extrait de chaque épiderme reconstruit, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR pour l'expression de la filaggrine FLG (a), loricrine LOR (b), CA2 (c) et NELL2 (d). Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. Cette expérience a été réalisée une fois.



**Figure 13 : Analyse de l'expression relative en ARNm de IL-13Ra1 (a) et IL-13Ra2 (b) dans des RHE déplétés du cholestérol et/ou stimulés par les interleukines pendant 48h.** (a, b) Les RHE arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont incubés pendant 2h en présence de MβCD et ensuite laissés récupérer dans du milieu de culture frais pendant 48h ou sont incubés en présence des IL-4, IL-13 et IL-25 pendant 48h. D'autres épidermes reconstruits sont stimulés par la combinaison de ces deux traitements ou ne sont soumis à aucun traitement et exploités 48h plus tard. L'ARN total est extrait de chaque épiderme reconstruit, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR. Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. Les barres d'erreur représentent un intervalle de confiance de 95% ; une analyse statistique ANOVA1 a été réalisée sur les ΔCq (\*\*\*P < 0,01; n = 3 expériences indépendantes).

## **1.1 Validation du traitement par l'expression des gènes marqueurs de DA**

Dans un premier temps, l'efficacité des traitements appliqués aux épidermes reconstruits est vérifiée par l'analyse de l'expression en ARNm de la filaggrine, loricrine, CA2 et NELL2. Une expression augmentée de CA2 et NELL2 (Fig 12 c, d) ainsi qu'une expression diminuée de la filaggrine et loricrine (Fig 12 a, b) sont observées et le sont davantage en présence de la combinaison des traitements (Fig 12). Les résultats confirment l'exacerbation des effets des IL-4, IL-13 et IL-25 lorsque leur stimulation est précédée d'une déplétion du cholestérol comme retrouvé dans le modèle en RHE sur lequel se base notre investigation et qui vise à mimer les caractéristiques d'une peau de patient atteint de DA (De Vuyst, en préparation).

L'efficacité des traitements aux interleukines IL-4, IL-13 et IL-25, précédées ou non de 2h d'incubation en présence de la M $\beta$ CD, ayant été contrôlée, l'expression des récepteurs IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2 et IL-4R $\alpha$  est analysée au sein des RHE soumis à ces traitements.

## **1.2 Effets de la déplétion du cholestérol et stimulation par IL-4, IL-13, IL-25 sur l'expression des chaînes de récepteurs IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2 et IL-4R $\alpha$**

### **1.2.1 Analyse de l'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2**

L'expression de IL-13R $\alpha$ 1 semble légèrement induite dans les épidermes reconstruits déplétés du cholestérol après 48h de récupération. Une expression similaire de IL-13R $\alpha$ 1 est également retrouvée dans les RHE en réponse aux IL-4, IL-13 et IL-25. De manière intéressante, la combinaison de ces traitements semble augmenter l'expression de cette chaîne de récepteur en comparaison aux traitements isolés (Fig 13 a). Cependant, ces tendances à l'augmentation ne sont pas significatives, les variations d'expression entre les réplicas ne permettant pas d'obtenir des différences statistiques entre les conditions de traitements.

Les interleukines semblent exercer peu d'effets sur la régulation de ce récepteur. Ceci est conforté par une étude de David et al, où l'expression de IL-13R $\alpha$ 1 ne présente pas de variations significatives suite à l'ajout de IL-4 ou de IL-13 (M. David, Ford, Bertoglio, Maizel, & Pierre, 2001).

La déplétion du cholestérol seule ne permet pas de déclencher une expression significative de IL-13R $\alpha$ 1, ce qui rejoint l'étude de son expression en monocouches après perturbation des microdomaines lipidiques (Fig 3-1 a).

L'expression de IL-13R $\alpha$ 2 est augmentée de manière importante suite au traitement aux interleukines IL-4, IL-13, IL-25 et aux interleukines combinées à une incubation préalable en présence de M $\beta$ CD. Son augmentation est hautement significative pour ces deux conditions (Fig 13 b).

L'effet de la déplétion du cholestérol seule sur l'expression de ce récepteur n'est pas, par contre, apparent après 48h de récupération (Fig 13 b). Ceci semble conforter ce qui a été observé en monocouches où l'expression de IL-13R $\alpha$ 2, après avoir été maximale 4h après la fin du traitement, décline fortement à 24h de récupération (Fig 3-1 b).

L'effet des interleukines sur l'expression de cette chaîne de récepteur est clairement visible et la combinaison des traitements semble augmenter cet effet mais sans différence statistique. L'exposition des épidermes reconstruits aux interleukines est associée à une régulation de l'expression du récepteur IL-13R $\alpha$ 2, ce qui a également été démontré dans une étude portant sur des kératinocytes HaCat (M. David et al., 2001).

Au regard des Cq correspondant aux chaînes de récepteur IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2, il apparaît que l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 est très faiblement exprimée dans des conditions contrôles non traitées (Cq~31) alors que dans ces mêmes conditions, IL-13R $\alpha$ 1 dont l'expression



correspond à un Cq plus bas (Cq~28) serait donc déjà exprimée à un niveau basal au sein du tissu épidermique reconstruit.

L'ensemble des analyses de l'expression en ARNm des récepteurs IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 ont été réalisées selon trois expériences indépendantes. Il apparaît peu de variations de l'expression du récepteur IL-13R $\alpha$ 1 (Cq~28 à Cq~27) en comparaison à la forte induction de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 (Cq~31 à Cq~23,5) en réponse aux interleukines et à la combinaison des traitements.

L'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$  n'a pu être évaluée pour les mêmes raisons que décrites dans la section « modèle en monocouches et déplétion du cholestérol ». En conséquence, afin de pouvoir examiner l'expression de ce récepteur, une analyse par Western blot a été réalisée.

### **1.2.2 Analyse de l'expression protéique des IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2**

L'expression protéique de IL-4R $\alpha$ , requérant des conditions non réductrices, n'a pas donné de résultats. L'utilisation de tampon de lyse non réducteur, relativement « doux » comparé au tampon de lyse dénaturant, complique l'extraction protéique. La concentration en protéines est dès lors probablement trop faible que pour détecter la présence du récepteur. Cette analyse de l'expression protéique nécessite dès lors encore quelques ajustements techniques.

L'expression en protéine de IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 n'a pu être évaluée pour les mêmes raisons que décrites dans la section « modèle en monocouche et déplétion du cholestérol ».

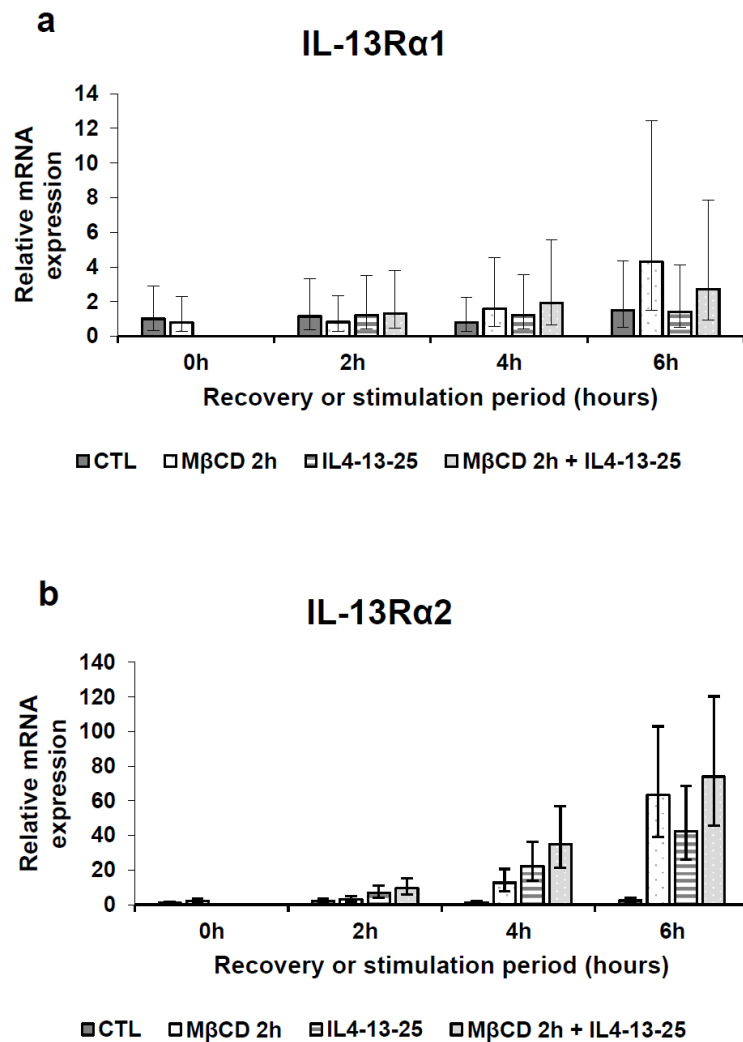
## **2 Déplétion du cholestérol et stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 au cours d'une cinétique de récupération/stimulation**

L'expression en ARNm des récepteurs IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 semble être davantage impactée par la combinaison des traitements « 2h de M $\beta$ CD et 48h de stimulation par les interleukines IL-4, IL-13, IL-25 ». Il apparaît dès lors intéressant d'examiner les effets associés à la déplétion du cholestérol et/ou à la stimulation aux interleukines à des temps précoces, sur la régulation des récepteurs, tant au niveau de leur expression que de leur signalisation. Ceci est réalisé en vue de cibler et de comprendre l'origine de l'apparition du phénomène synergique potentiel observé à 48h. Il est alors nécessaire d'adapter le traitement en réalisant des temps plus courts de récupération et de stimulation.

Les épidermes arrivés à leur 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont incubés pendant 2h en présence de M $\beta$ CD afin de les dépler du cholestérol et laissés récupérer ensuite ou non (0h) dans un milieu de culture sans HC pendant 2h, 4h ou 6h (M $\beta$ CD 2h) et/ou stimulés avec les IL-4, IL-13 et IL-25 pendant les mêmes périodes (M $\beta$ CD 2h + IL4-13-25). Des RHE n'ayant subi aucun traitement servent de conditions contrôles aux différents temps étudiés (CTL).

### **2.1 Effets de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par les IL-4, IL-13, IL-25 sur l'expression des récepteurs des IL-4 et IL-13**

Pour l'expression de IL-13R $\alpha$ 1, une tendance à l'augmentation, qui se fait de manière progressive, est observée selon les différents temps de récupération/stimulation et plus particulièrement pour les RHE déplétés du cholestérol (« 2h M $\beta$ CD ») avec ou sans stimulation par les IL-4, IL-13, IL-25 (Fig 14 a). Le pic d'expression, observé pour les RHE déplétés du cholestérol supérieur à celui associé à la combinaison des traitements, mérite



**Figure 14 : Analyse de l'expression relative en ARNm de IL-13R $\alpha$ 1 (a) et IL-13R $\alpha$ 2 (b) dans des épidermes reconstruits déplétés du cholestérol et/ou stimulés par les interleukines au cours d'une cinétique de temps de récupération ou stimulation. (a, b) Les RHE obtenus au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont déplétés du cholestérol et placés ensuite dans du milieu de culture frais (MβCD 2h) ou en présence des IL-4, IL-13 et IL-25 (IL4-13-25) selon différentes périodes de récupération ou stimulation (0h, 2h, 4h et 6h). Des épidermes reconstruits à J11 sont stimulés par la combinaison de ces deux traitements (MβCD 2h + IL4-13-25). Des RHE soumis à aucun traitement ont été récupérés aux différents temps de récupération/stimulation correspondants et représentent les épidermes « contrôles » (CTL). L'ARN total est extrait de chaque épiderme reconstruit, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR. Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. Les barres d'erreur représentent un intervalle de confiance de 95% ; une analyse statistique ANOVA2 a été réalisée sur les  $\Delta$ Cq (n = 2 expériences indépendantes).**

d'être confirmé. En effet, les deux expériences réalisées ont montré des résultats contradictoires pour cette période de récupération/stimulation.

La régulation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 est sensible aux différents traitements appliqués aux épidermes reconstruits à J11. Son expression commence à augmenter dès 2h de récupération ou dès 2h de stimulation avec le mélange IL-4, IL-13 et IL-25 après ou non déplétion du cholestérol. Cette augmentation se fait de manière progressive au cours des temps de récupération/stimulation et apparaît beaucoup plus prononcée que pour la régulation transcriptionnelle de IL-13R $\alpha$ 1 (Fig 14 b). Contrairement à IL-13R $\alpha$ 1, la stimulation des épidermes reconstruits par les interleukines uniquement affecte l'expression de IL-13R $\alpha$ 2. De manière intéressante, la combinaison des traitements est associée à une exacerbation de l'expression de ce récepteur (Fig 14 b).

Pour les RHE déplétés du cholestérol, le pic d'expression du récepteur observé après 6h de récupération (Fig 14 b) mérite confirmation.

Compte tenu de l'expression constante observée au cours des temps de récupération/stimulation de IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 pour les conditions contrôles, les effets observés sur l'expression des récepteurs sont imputables seuls aux différents traitements.

L'analyse de l'expression en ARNm des récepteurs IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 selon la cinétique 0h, 2h, 4h et 6h a été réalisée à partir de deux expériences indépendantes, insuffisantes que pour pouvoir tirer une conclusion statistique. Cette expérience doit dès lors être répétée au moins une troisième fois.

L'expression en ARNm de IL-4R $\alpha$  n'a pu être évaluée pour les mêmes raisons que décrites dans la section « modèle en monocouches et déplétion du cholestérol ».

## **2.2 Effets de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par les IL-4, IL-13, IL-25 sur la signalisation cellulaire**

L'activation de la signalisation cellulaire comme conséquence possible de la déplétion du cholestérol et/ou stimulation aux interleukines associées à la réponse Th2, a ensuite été étudiée lors d'une cinétique de récupération ou de stimulations aux interleukines (0h, 2h, 4h et 6h). La régulation de la signalisation est analysée par le biais de la voie JAK-STAT6 par laquelle les IL-4 et IL-13 exercent essentiellement leurs effets. L'activation des voies des MAPK p38 et ERK1/2 rapportées dans la littérature comme activées en réponse à la stimulation aux interleukines ou en réponse à la déplétion du cholestérol font également partie de cette analyse.

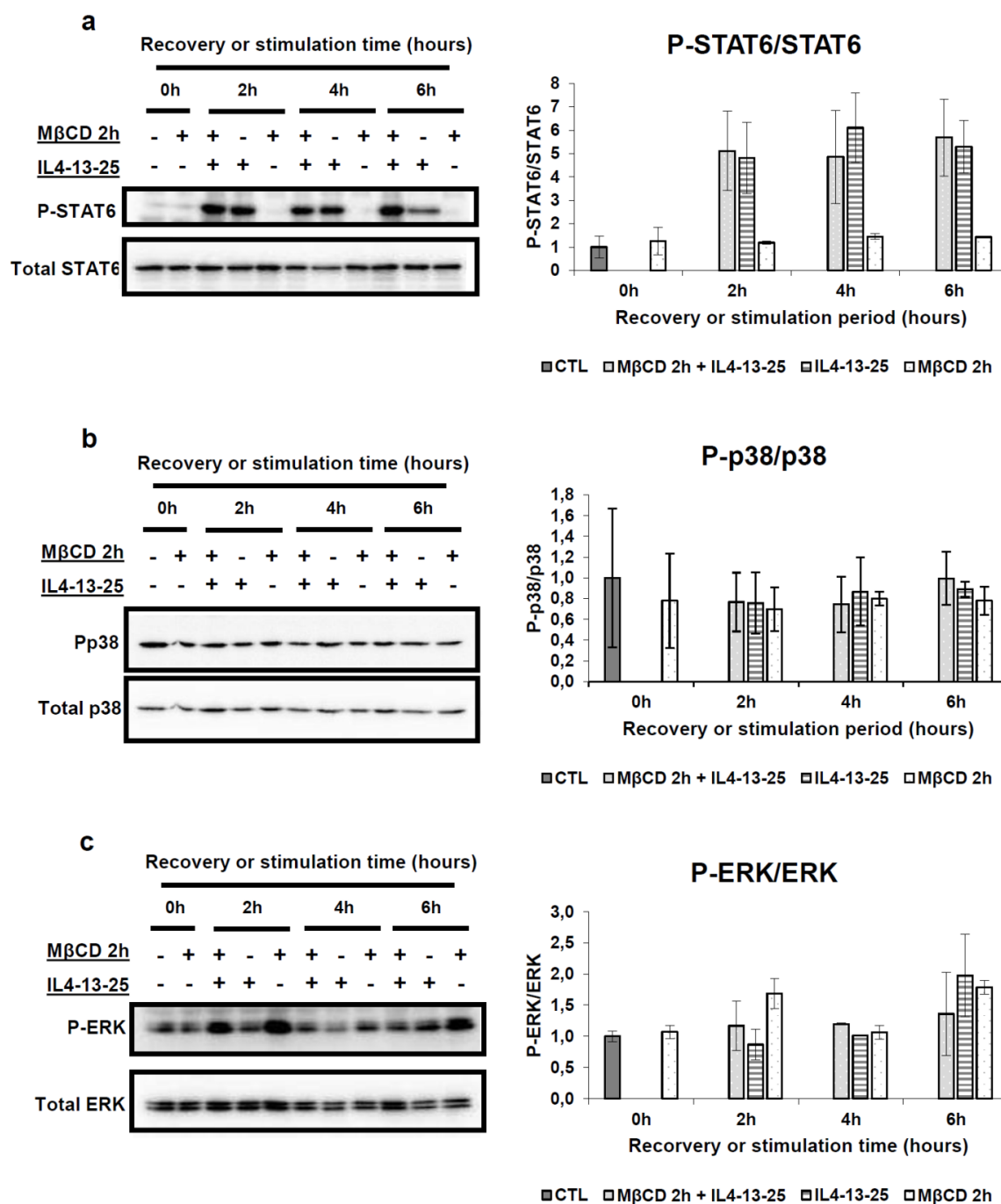
### **2.2.1 Analyse de la signalisation de la voie JAK-STAT6**

L'activation de la voie JAK-STAT6 apparaît dès stimulation aux interleukines et est constante quelle que soit la durée de stimulation. La combinaison des traitements « 2h M $\beta$ CD et IL-4, IL-13, IL-25 » ne semble pas accentuer l'activation de STAT6 (Fig 15 a), suggérant que la déplétion du cholestérol ne semble pas jouer de rôle dans la phosphorylation de STAT6. Celle-ci serait alors imputable aux interleukines qu'elles soient précédées ou non de la déplétion du cholestérol.

Il serait dès lors intéressant d'analyser la voie JAK-STAT6 à des temps plus courts de récupération comme réalisé dans les monocouches où les résultats semblaient plus concluants.

### **2.2.2 Analyse de la signalisation des voies des MAPKs p38 et ERK1/2**

Une activation de la sérine/thréonine kinase p38(Thr180/Tyr182) est observée pour les différentes conditions analysées y compris pour la condition contrôle. La phosphorylation de



**Figure 15 : Analyse de la phosphorylation de STAT6 (a) et des MAPKs p38 (b) et ERK1/2 (c) dans des RHE déplétés du cholestérol et/ou stimulés par les interleukines au cours d'une cinétique de temps de récupération ou stimulation. (a-c)** Les RHE sont incubés en présence de MβCD et ensuite laissés récupérer pour différentes périodes de récupération (0h, 2h, 4h et 6h) ou les épidermes sont incubés des interleukines IL-4, IL-13 et IL-25 pour différentes périodes de stimulation (2h, 4h et 6h) au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction. Des RHE ont également été préalablement déplétés du cholestérol et ensuite stimulés avec le mélange d'interleukines IL-4, IL-13 et IL-25 pendant 2h, 4h ou 6h. Des épidermes à J11 sont exploités aux différents temps de récupération/stimulation définis et constituent les RHE « contrôles ». Les extraits protéiques sont analysés par analyse Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes totales de STAT6, p38 et ERK1/2 ainsi que les formes phosphorylées P-STAT6 (Tyr641), Pp38 et P-ERK1/2. Les bandes spécifiques aux formes phosphorylées de STAT6, p38 et ERK1/2 sont quantifiées et analysées au cours du temps de récupération/stimulation après incubation ou non avec la MβCD et stimulation ou non avec les interleukines. Les résultats sont normalisés par rapport aux signaux protéiques des formes totales STAT6, p38 et ERK1/2, utilisés comme contrôle de charge. Chaque donnée reportée dans le graphe représente la moyenne  $\pm$  SD relative de deux expériences indépendantes. Les données ont été soumises à un test statistique de type ANOVA2 *repeated measures* (n = 2).

p38 ne présente pas de différence perceptible dans les RHE traités en comparaison aux RHE contrôles, quelles que soient les durées de récupération ou de stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 et après ou non déplétion du cholestérol (Fig 15 b). Le profil d'activation est différent de celui observé en monocouches où la phosphorylation de p38 est observée uniquement et de manière significative en réponse à la déplétion du cholestérol et varie selon les temps de récupération (Fig 7 a).

L'activation de la sérine/thréonine kinase ERK1/2(Thr202/Tyr204) présente des variations selon la nature du traitement et la durée de récupération ou de stimulation aux interleukines, en comparaison à l'activation de base observée en situation contrôle.

La kinase ERK1/2 est davantage phosphorylée dans les RHE déplétés du cholestérol et soumis à 2h de récupération ou 2h de stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 (Fig 15 c). Ceci suggère l'implication de la déplétion du cholestérol dans l'augmentation de l'activation de la kinase ERK1/2. Alors que le profil d'activation semble s'atténuer à des périodes de 4h de récupération et de stimulation, il est à nouveau légèrement élevé après 6h de stimulation aux interleukines sans activation préalable des RHE par la déplétion du cholestérol ou après 6h de récupération. La combinaison des traitements semble légèrement atténuer la phosphorylation de ERK1/2 (Fig 15 c). Les réplicas étant associés à une grande variabilité, et plus spécifiquement pour 6h de récupération/stimulation, il est difficile de se prononcer quant au profil d'activation induit en réponse aux différents traitements. Cette expérience mériterait d'être répétée.

En comparaison aux monocouches déplétées du cholestérol, le profil d'activation de la kinase ERK1/2 paraît différent puisqu'elle n'était activée que pour les conditions traitées avec la M $\beta$ CD (Fig 7 b).

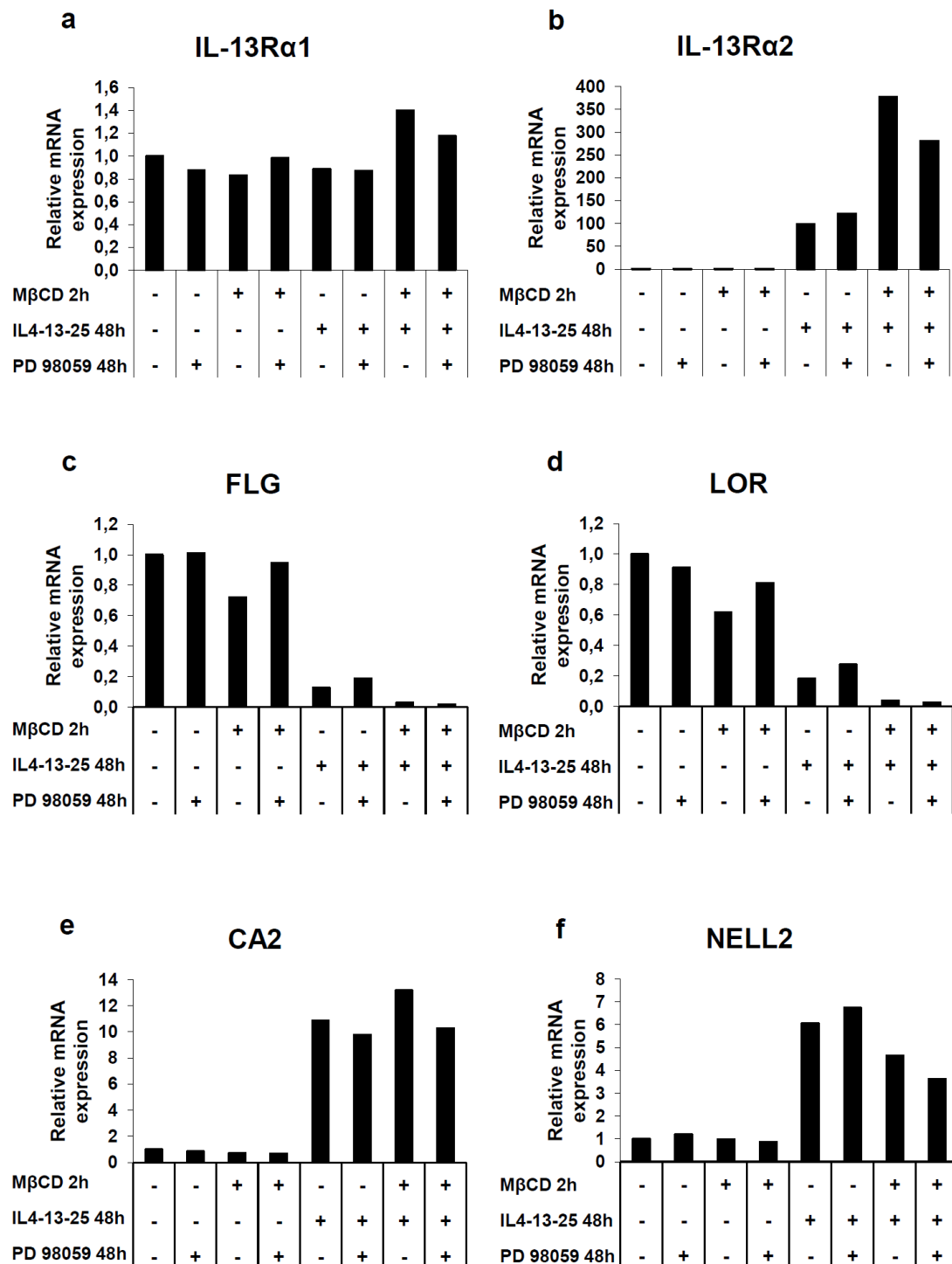
La phosphorylation des MAPKs p38 et ERK1/2 observée pour les RHE contrôles pourrait s'expliquer par l'implication de ces voies dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation. L'analyse en Western blot se fait à partir d'une lyse totale du tissu épidermique, composé de kératinocytes à divers stades de différenciation et dans lequel les cellules de la couche basale ont toujours leur potentiel prolifératif. L'analyse de la signalisation dans un modèle en RHE, stratifié, apparaît dès lors plus complexe.

Les expériences relatives à la signalisation ont été reproduites deux fois. Plusieurs contrôles ont été effectués pour l'une des expériences et ne présentaient pas de variation selon les temps de récupération ou de stimulation (résultats non montré).

La combinaison des traitements « 2h M $\beta$ CD et IL-4, IL-13, IL-25 » ne semble pas apporter une augmentation de la phosphorylation des MAPKs p38 et ERK1/2, ainsi que de STAT6. Cependant, sur base de l'analyse de la signalisation en monocouches, il serait intéressant ultérieurement d'investiguer plus particulièrement les effets associés à la stimulation par IL-4 sur des épidermes reconstruits.

### **2.3 Implication de ERK1/2 dans les réponses cellulaires activées suite à la déplétion du cholestérol et la stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25**

La caractérisation des conséquences induites par l'activation de la kinase ERK1/2 observée particulièrement en réponse à la déplétion du cholestérol a ensuite été entreprise sur l'expression des gènes d'intérêt dans les RHE déplétés du cholestérol et/ou stimulés par les IL-4, IL-13 et IL-25. La RT-PCR quantitative, utilisée pour déterminer les niveaux relatifs d'expression d'ARNm des gènes cibles a été analysée dans une expérience indépendante et mérite dès lors d'être confirmée par la suite.



**Figure 16 : Effets du PD 98059 sur l'expression relative en ARNm de IL-13Rα1 (a) et IL-13Rα2 (b) ainsi que des gènes marqueurs de DA (c-f) dans des épidermes reconstruits après déplétion du cholestérol et/ou stimulation aux interleukines pendant 48h.** Les RHE arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont incubés en présence de la MβCD durant 2h et/ou stimulés par les IL-4, IL-13 et IL-25. Les épidermes reconstruits sont incubés en présence PD 98059 conjointement aux traitements décrits. L'ARN total est extrait de chaque épiderme reconstruit, rétro-transcrit en cDNA et analysé par RT-qPCR pour les expressions de IL-13Rα1 (a), IL-13Rα2 (b), FLG (c), LOR (d), CA2 (e) et NELL2 (d). Les données sont normalisées au gène de référence RPLP0 et exprimées de manière relative par rapport à la condition non traitée pour laquelle l'expression en ARNm est arbitrairement établie à 1 pour chaque gène analysé. Cette expérience a été réalisée une fois.

Les RHE à J11 ont été traités en présence ou non d'un inhibiteur spécifique des MEK 1/2 (PD 98059), une protéine kinase responsable de la phosphorylation de ERK 1/2. Le PD 98059 diminue la phosphorylation d'ERK1/2 observée suite au traitement des épidermes reconstruits avec la M $\beta$ CD et/ou les interleukines (résultats non montrés).

Nous avons ainsi évalué l'implication de la MAPK ERK1/2 dans l'augmentation de l'expression des chaînes de récepteurs IL-13R $\alpha$ 1 et en particulier, IL-13R $\alpha$ 2 dont l'expression est montrée fortement induite en réponse aux interleukines combinées ou non à la déplétion du cholestérol. Le choix d'inhiber spécifiquement cette kinase a été motivé sur base de la littérature rapportant son activation potentielle dans la régulation de la chaîne  $\alpha$ 2 (M. David et al., 2001) et après analyse de la signalisation associée à la déplétion du cholestérol et aux interleukines. Peu de variations sont retrouvées pour le profil d'expression de IL-13R $\alpha$ 1 (Fig 16 a) en présence de l'inhibiteur PD 98059 alors que l'expression de la chaîne  $\alpha$ 2 associée à la combinaison des traitements semble dépendre en partie de l'activation de la MAPK ERK1/2, comme en témoigne la diminution du pic d'expression en présence de l'inhibiteur des MEK1/2 (Fig 16 b).

Comme une conséquence possible de l'activation de ERK1/2 en réponse à la déplétion du cholestérol, l'expression des marqueurs de la différenciation, filaggrine et loricrine ainsi que de CA2 et NELL2, gènes montrés surexprimés dans la DA, a été investiguée sous les mêmes conditions de traitements.

Dans le cas des combinaisons de traitements, les conditions traitées en présence de l'inhibiteur PD 98059, en comparaison de son absence, montrent une expression diminuée de CA2 et NELL2 (Fig 16 e, f) alors que peu de différences sont observées pour l'expression de la filaggrine et loricrine (Fig 16 c, d). Néanmoins, NELL2 ne semble pas avoir réagi de la même manière lors de l'activation des kératinocytes avec la combinaison des traitements.

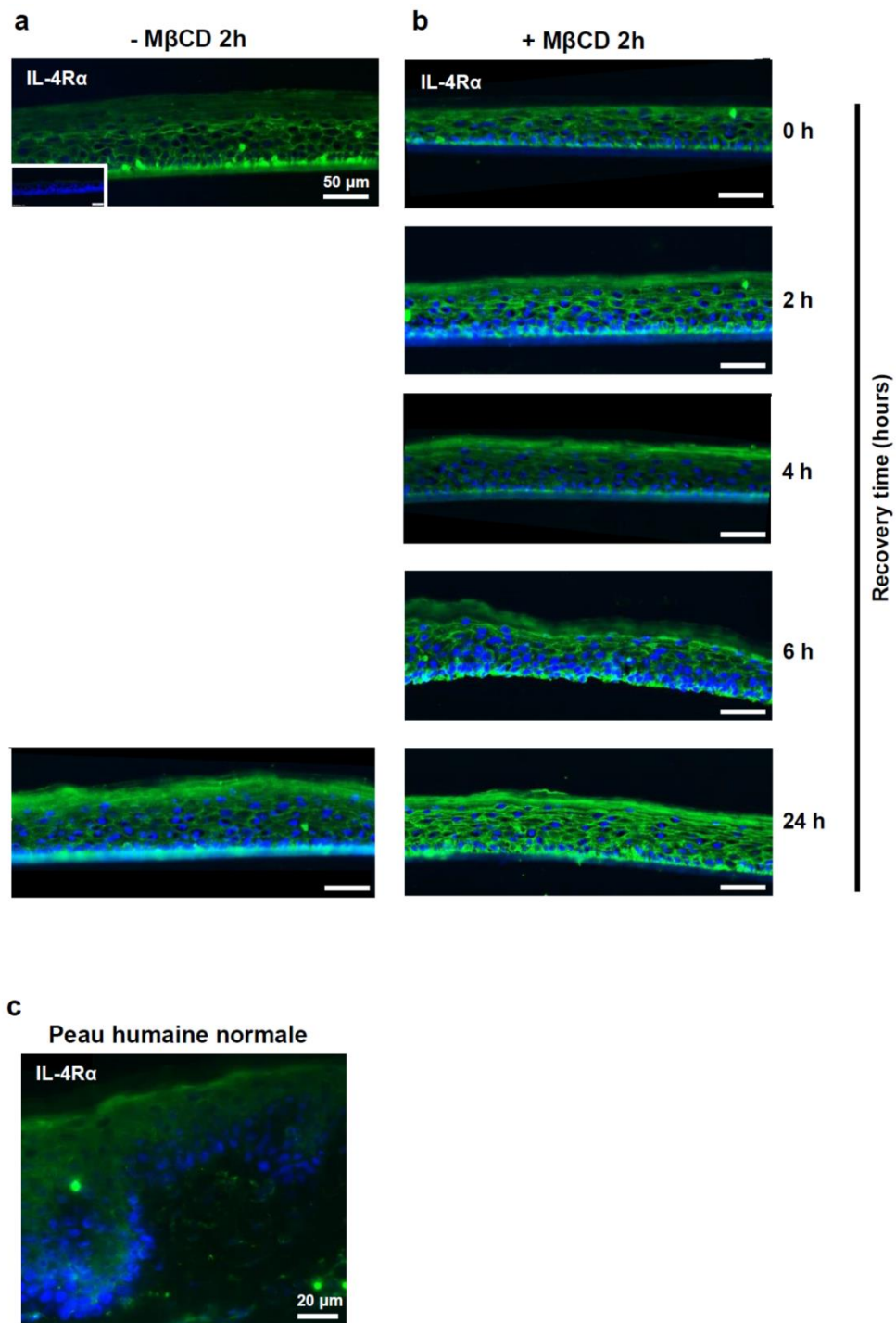
Ceci suppose que l'augmentation de l'expression de CA2 passerait en partie par l'activation de la voie MAPK ERK1/2 alors que l'expression de la filaggrine et loricrine ne dépendrait pas de son activation. Ces deux marqueurs de différenciation semblent dépendre davantage de la stimulation par les interleukines. Il serait intéressant d'inhiber la voie JAK-STAT6 afin de déterminer le degré de contribution de son activation dans la dérégulation de la différenciation des kératinocytes.

Ces résultats font suite à une seule expérience et ne peuvent donner lieu à des interprétations définitives.

## **2.4 Localisation de IL-4R $\alpha$ au sein d'un épiderme reconstruit sain et après déplétion du cholestérol**

La transduction du signal étant médiée par les récepteurs aux IL-4 et IL-13, il est intéressant d'analyser leur localisation au sein des épidermes reconstruits afin de déterminer les couches épidermiques qui seraient éventuellement davantage impactées par les effets aux interleukines. L'effet de la déplétion du cholestérol sur l'expression des récepteurs au sein du tissu épidermique reconstruit est également analysée, puisque susceptible d'induire une relocalisation du récepteur et contribuer ainsi à l'amélioration des effets observés avec la combinaison des traitements en comparaison aux interleukines seules.

Un marquage du récepteur IL-4R $\alpha$  est réalisé dans des épidermes reconstruits arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction non traités ou déplétés du cholestérol et soumis à une cinétique de récupération dans du milieu de culture sans HC (0h, 2h, 4h, 6h et 24h). Cet immunomarquage est destiné à localiser le récepteur au sein des tissus épidermiques reconstruits et de mettre en évidence éventuellement un effet de la perturbation des microdomaines sur cette localisation.



**Figure 17 : Analyse de la localisation de IL-4Rα dans les épidermes reconstruits après déplétion (b) ou non du cholestérol (a) et au sein de l'épiderme *in vivo* (c).** (a, b) Les RHE arrivés au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction sont traités durant 2h avec de la MβCD (7,5 mM) et ensuite laissés récupérer ou non (0h) pendant des périodes de 2h, 4h, 6h et 24h. Des RHE à leur 11<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour de reconstruction servent respectivement de contrôles pour les temps 0h et 24h. (a, b) Des sections de ces épidermes reconstruits traités ou sains ainsi que (c) de peau saine humaine sont immunomarquées avec l'anticorps anti-IL-4Rα reconnu par un anticorps secondaire anti IgG de souris couplé à une sonde fluorescente, AlexaFluor 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec le Hoescht (bleu). Les micrographies des contrôles négatifs, pour lesquels l'anticorps primaire n'est pas présent sont insérés sous forme d'encarts dans le coin inférieur gauche. Barre d'échelle = 50 μm (grossissement 20x).



Cette approche par immunofluorescence, bien que très peu précise d'un point de vue quantitatif, permet également de renseigner sur l'expression protéique du récepteur IL-4R $\alpha$  qui n'a pas pu être évaluée en Western blot.

Un marquage du récepteur IL-4R $\alpha$  sur des coupes à congélation correspondant aux différentes conditions est réalisé en utilisant un anticorps anti-IL-4R $\alpha$  reconnu spécifiquement par un anticorps anti IgG de souris couplé à un fluorochrome Alexa 488 (vert). Un marquage direct des noyaux est également effectué à l'aide de Hoechst (bleu).

#### **2.4.1 Localisation du récepteur au sein d'un équivalent épidermique humain sain et d'une peau humaine saine**

Suivant l'analyse du marquage réalisé pour les RHE non traités, le récepteur IL-4R $\alpha$  semble se localiser dans l'entièreté des couches de l'épiderme reconstruit et être davantage présent au niveau de la couche basale et de la couche granuleuse (Fig 17 a). En fonction des couches de l'épiderme, une localisation cellulaire du récepteur paraît différente. Le récepteur IL-4R $\alpha$  semble se localiser surtout en périphérie cellulaire dans l'ensemble des couches de l'épiderme, excepté dans la couche basale où le récepteur paraît également se trouver au niveau intracytoplasmique dans l'ensemble de la cellule.

La localisation du récepteur IL-4R $\alpha$  au sein de la peau normale humaine, utilisée comme contrôle positif pour sa détection, semble davantage se trouver dans la couche granuleuse. Un marquage légèrement plus intense semble se distinguer également au niveau de la couche basale (Fig 17 c).

En vue d'évaluer la spécificité de l'anticorps anti-IL4R $\alpha$ , des coupes de cerveau humain ont été utilisées comme contrôle « négatif » de l'expression du récepteur. Le cortex cérébral est rapporté exprimer peu de récepteurs à IL-4 dans la base de données « Human Protein Atlas ». Néanmoins, les marquages sont associés à une grande aspécificité de l'anticorps secondaire, anti IgG murin – Alexa 488, les échantillons cérébraux étant probablement trop vieux. Il est difficile de trouver et de se procurer des tissus rapportés comme associés à une faible expression de ce récepteur ubiquitaire.

#### **2.4.2 Effet de la déplétion du cholestérol sur la localisation du récepteur au sein d'épidermes reconstruits déplétés du cholestérol**

Sur bases des résultats obtenus et en comparaison aux conditions « contrôles 0h et 24h », le marquage du récepteur semble augmenter au fur et à mesure des temps de récupération (Fig 17 b). Ces observations sont toutefois à confirmer.

Compte tenu de l'hétérogénéité du marquage selon les différentes conditions, ces résultats sont difficilement interprétables. Aucune conclusion concernant un effet de la déplétion du cholestérol sur une éventuelle localisation différentielle du récepteur ne peut être donnée. Cette expérience a été réalisée une fois dans les conditions de fixation d'acétone/méthanol. Une même hétérogénéité du marquage est retrouvée également lors de la réalisation de cette expérience sur des coupes en paraffine fixées dans du formol acétique (FA) (résultats non montrés).

Des études précédentes ont montré que la déplétion du cholestérol induite par la M $\beta$ CD dans des cultures de kératinocytes en monocouches ou dans des RHE mène à des altérations dans la signalisation cellulaire, résultant en un phénotype activé des kératinocytes. Cette activation a été associée à des régulations de l'expression d'un grand nombre de gènes, parmi lesquels se trouvent des gènes produisant un phénotype cellulaire proche des profils d'expression trouvés dans la peau des patients atteints de DA. D'autre part, une recherche menée dans notre laboratoire par E. De Vuyst dans le cadre de sa thèse a montré, au sein des RHE, la présence d'une synergie associant la déplétion du cholestérol membranaire et la stimulation des kératinocytes par des interleukines liées à la réponse Th2, prédominante dans la DA. Cette synergie est associée à des différences morphologiques de l'épiderme, des régulations similaires de l'expression de gènes impliqués dans des lésions de la DA et à des altérations plus prononcées de la barrière épidermique en comparaison à la seule stimulation par les interleukines IL-4, IL-13 et IL-25.

Dans ce travail, nous analysons, pour la première fois, la régulation de IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 dans des cultures de kératinocytes humains en monocouches et au sein d'épidermes reconstruits, après déplétion du cholestérol et/ou stimulation aux interleukines IL-4, IL-13 et IL-25. Cette recherche vise à clarifier le mécanisme impliqué dans l'augmentation des effets observée au sein des RHE lors de la combinaison des traitements. Les récepteurs de IL-25 ont été écartés de notre étude afin de limiter nos investigations à la réponse Th2, dont deux cytokines effectrices majeures sont les IL-4 et IL-13.

La démarche suivie dans le cadre de cette recherche s'est portée dans un premier temps sur l'analyse des récepteurs aux IL-4 et -13 dans un modèle de kératinocytes en monocouches, modèle plus simple que celui des épidermes reconstruits.

## **1 Étude de la régulation des récepteurs des IL-4 et IL-13 dans des kératinocytes humains cultivés en monocouches**

Dans ce modèle en monocouches, nous avons investigué l'implication possible de la perturbation des microdomaines lipidiques dans la régulation des récepteurs aux IL-4 et IL-13, au niveau de leur expression, de leur signalisation et de leur localisation cellulaire. La phosphorylation de STAT6, rapportée comme étant un intermédiaire clé dans la signalisation aux IL-4 et IL-13, a été analysée afin d'évaluer l'activation des récepteurs IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 indépendamment de leur ligand IL-4, IL-13.

**L'analyse de l'expression des différentes chaînes des récepteurs aux IL-4 et -13** après déplétion du cholestérol s'est limitée au niveau transcriptionnel aux chaînes IL-13R $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 et au niveau protéique à la chaîne IL-4R $\alpha$ .

Les niveaux d'ARNm codant de IL-13R $\alpha$ 1 ne varient pas en réponse à la déplétion du cholestérol, alors que ceux de IL-13R $\alpha$ 2 sont fortement induits de manière significative après 4 h et 24 h de récupération. Cette augmentation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2, consécutive à la perturbation des microdomaines lipidiques, corrobore des données d'analyse transcriptomique, selon lesquelles ce récepteur est surexprimé à la fois dans des cultures confluentes de kératinocytes humains déplétés du cholestérol (Mathay et al., 2011) et dans des kératinocytes issus de biopsies de peau lésionnelle de DA (Lu et al., 2009).

D'autre part, l'abondance protéique de IL-4R $\alpha$  apparaît être stable selon les données du Western blot après déplétion du cholestérol et lors de la phase complète de récupération. Le marquage en immunofluorescence de IL-4R $\alpha$  apparaît plus prononcé au sein des kératinocytes déplétés du cholestérol comparé aux cellules saines. La discordance entre les

résultats de IL-4R $\alpha$  observés en Western blot et en immunofluorescence pourrait être due à une liaison aspécifique de l'anticorps anti-IL-4R $\alpha$  dont la spécificité n'a pu être testée en l'absence de cellules ou de tissus humains surexprimant ce récepteur ubiquitaire ou déficients pour celui-ci. La spécificité de l'anticorps devrait donc être vérifiée.

Indépendamment de la validation de l'anticorps, ces résultats pourraient refléter un phénomène d'internalisation éventuelle du récepteur IL-4R $\alpha$  consécutive à la perturbation des microdomaines lipidiques.

**L'analyse de la localisation subcellulaire de IL-4R $\alpha$**  semble en effet montrer son internalisation suite à la perturbation des microdomaines lipidiques ainsi qu'en réponse à la stimulation par IL-4. Cette internalisation pourrait dès lors être à la fois ligand-indépendante et ligand-dépendante. Néanmoins, elle ne semble pas correspondre à une endocytose du récepteur au sein de vésicules associées au marqueur d'endosome précoce EEA1 tout du moins en réponse à la déplétion du cholestérol. L'internalisation potentielle rencontrée dans nos conditions ne semble pas corroborer ce qui a été rapporté dans l'étude de Gandhi *et al* sur des cellules HEK293T (Gandhi et al., 2014; Kurgonaite et al., 2015) où l'internalisation constitutive du récepteur, médiée par l'actine, Rac-1 et Pak, correspond essentiellement aux endosomes corticaux porteurs de EEA1 et ancrés sous la membrane plasmique dans un cortex d'actine.

Pour vérifier si l'internalisation montrée dans nos conditions ne rencontre pas le type d'internalisation relayé par Gandhi *et al*, il serait intéressant d'analyser les plans cellulaires proches de la membrane planaire, correspondant à la membrane plasmique côté basal des kératinocytes en culture. Ceci permettrait de détecter éventuellement des récepteurs IL-4R $\alpha$  associés à EEA1 au niveau de la membrane plasmique. Il est en effet important de vérifier si la déplétion du cholestérol n'affecte pas ce type d'internalisation car il paraît essentiel pour la transduction du signal qui fait suite à l'activation de IL-4R et IL-13R, en permettant la concentration des chaînes IL-4R $\alpha$  et IL-13R $\alpha$ 1 et ainsi leur dimérisation efficace. Cette voie d'endocytose constitue un prérequis pour la signalisation de IL-4R comme le montre la diminution de la signalisation JAK-STAT en réponse à IL-4 lorsque la formation de ces endosomes est inhibée (Gandhi et al., 2014; Kurgonaite et al., 2015).

L'internalisation du récepteur IL-4R a été principalement étudiée sur le complexe du récepteur de type I IL-4R $\alpha$ /IL-2R $\gamma$ c, dont les affinités de liaison entre sous-unités sont différentes de celles rencontrées dans le complexe de récepteur de type II présent dans les kératinocytes, et dont la signalisation est restreinte aux cellules d'origine hématopoïétiques (Gandhi et al., 2014; Kurgonaite et al., 2015).

L'étude de la localisation subcellulaire de IL-4R $\alpha$  en microscopie confocale a révélé sa présence au sein du compartiment cytoplasmique dans les kératinocytes déplétés du cholestérol ou stimulés par les IL-4 et IL-13 mais également dans les kératinocytes non traités. Cette localisation du récepteur au sein du cytoplasme des kératinocytes sains pourrait s'expliquer par l'existence d'un processus d'endocytose constitutive du récepteur (Gandhi et al., 2014; Kurgonaite et al., 2015) et/ou par la présence de pools intracellulaires de IL-4R $\alpha$  mobilisables en surface membranaire comme rapporté pour IL-13R $\alpha$ 2 (Daines & Hershey, 2002). La présence d'un marquage plus prononcé en périphérie cellulaire observée après déplétion du cholestérol pourrait alors refléter une relocalisation du récepteur dans cette région suite à la perturbation des microdomaines lipidiques, plutôt que son internalisation.

Une éventuelle internalisation des récepteurs pourrait être précédée par une augmentation locale de IL-4R $\alpha$  et/ou IL-13R $\alpha$ 1 associés respectivement à JAK1 et JAK2/TYK2 au sein de

domaines lipidiques ordonnés tels que les microdomaines lipidiques. Ce mécanisme semble se produire pour les sous-unités de IL-2R (Kurgonaite et al., 2015; Lamaze et al., 2001) où une concentration constitutive des récepteurs IL-2R au sein des domaines membranaires spécialisés est couplée avec l'endocytose constitutive du récepteur chez des lymphocytes type natural killer (YT cells) (Lamaze et al., 2001).

**L'analyse de la localisation de IL-4R $\alpha$  au sein des microdomaines lipidiques** n'a pas apporté de résultats concluants. Le marquage des microdomaines lipidiques, par le biais de la liaison des sondes lysénine-mCherry aux SM endogènes, semble empêcher la liaison de l'anticorps anti-IL-4R $\alpha$ , alors que l'insertion membranaire des sondes BODIPY-SM ne résiste pas aux étapes associées à l'immunomarquage de IL-4R $\alpha$  et plus particulièrement à la perméabilisation des membranes cellulaires. Les sondes lysénine-mCherry et BODIPY-SM semblent ainsi présenter des sensibilités différentes aux étapes techniques associées au marquage de IL-4R $\alpha$ , reflétant des degrés d'interaction spécifiques des sondes avec les lipides de la membrane cellulaire.

La solution pour perméabiliser les membranes se compose de PBS et Triton X-100. Le Triton est un détergent non-ionique qui, par le biais d'un groupement polaire, mène à la perturbation de la structure membranaire et à la diminution de la compaction de la bicouche lipidique. Il est probable que l'insertion de la sonde BODIPY-SM au sein de la membrane plasmique ne résiste pas à l'action du Triton X-100 lors de la perméabilisation.

La détection en immunofluorescence de cibles intracellulaires dans des cellules marquées par les BODIPY-SM devrait se faire dans des conditions non perméabilisées.

La raison de l'absence de la détection du récepteur IL-4R $\alpha$  en présence des lysénine-mCherry liés aux SM reste inexplicée, dans la mesure où ce résultat a été reproduit trois fois.

L'une des explications possibles serait une modification de la conformation du récepteur suite à la liaison des sondes aux SM endogènes résultant en une perte de la reconnaissance de l'épitope par l'anticorps anti-IL-4R $\alpha$ . En effet, la liaison de ce type de sonde sur les SM pourrait affecter l'accès ou la structure de ces lipides et entraîner alors une altération de la conformation du récepteur, reflétant alors la possible proximité du récepteur par rapport aux SM. Bien qu'il ait été rapporté que la reconnaissance des SM par ces sondes ne semble pas induire de perturbation de la membrane chez des érythrocytes, la liaison des SM par la sonde pourrait cependant affecter le microenvironnement lipidique et subséquemment la conformation du récepteur, la composition en lipides membranaires variant selon les types cellulaires. Cette hypothèse pourrait être confortée par l'existence d'interactions lipides-protéines et plus particulièrement glycosphingolipides-protéines (Simons & Sampaio, 2011). D'autre part, l'enrichissement des sondes lysénine-mCherry (45kDa) dans les domaines lipidiques spécialisés, riches en SM, pourrait entraîner un encombrement stérique et empêcher la reconnaissance du récepteur par son anticorps spécifique. En effet, cette sonde présente une taille plus importante que le lipide ciblé, son diamètre étant de l'ordre de 15 fois supérieur celui d'une SM (Carquin et al., 2014).

Cette suggestion liée à la contrainte stérique a été rencontrée lors d'un co-marquage réalisé séquentiellement par la sonde lysénine-mCherry suivie par la sonde BODIPY-SM. Cette séquence de marquage ne permet pas à cette dernière de se lier (Carquin et al., 2014).

L'absence de marquage avec la sonde lysénine-mCherry pourrait témoigner d'une éventuelle interaction du récepteur avec son microenvironnement lipidique et impliquerait, en tout état de cause, les microdomaines lipidiques. La perturbation de ces microdomaines lipidiques semble, par ailleurs, mener à une relocalisation du récepteur qui pourrait être associée à son

activation. Ce processus a été montré pour le EGFR (Lambert et al., 2008; Lambert et al., 2006).

**L'analyse de la signalisation de IL-4R et IL-13R** montre que la déplétion du cholestérol semble induire une légère phosphorylation de STAT6 (Tyr641) pour des temps de récupération courts suggérant une régulation rapide de l'activation de la voie JAK-STAT6. Il a été en effet montré dans une recherche portée sur des kératinocytes murins que la phosphorylation de STAT6 pouvait être détectée dès 10 minutes après stimulation avec IL-4 ou IL-13 avant que le signal diminue plus ou moins rapidement en fonction de la nature des cytokines, en 10 ou 30 min respectivement (Omori-Miyake et al., 2014).

La phosphorylation de STAT6 observée pour des temps courts de récupération en réponse à la déplétion du cholestérol reste néanmoins peu marquée en comparaison de celle induite par la stimulation des kératinocytes par IL-4 associée à une activation significative de IL-4R. Une activation significative de STAT6 pourrait cependant se passer au sein de la période de 2h d'incubation en présence de M $\beta$ CD. Des périodes intermédiaires de traitement devraient être analysées afin de vérifier si une activation plus importante de la voie de STAT6 ne se produit pas dans notre expérience.

Bien que la voie JAK-STAT6 ait largement été rapportée comme étant la voie majeure de transduction du signal en réponse aux IL-4 et IL-13 (Omori-Miyake et al., 2014; Schindler et al., 2007), d'autres voies de signalisation impliquant notamment les MAPKs p38 et ERK1/2 peuvent être activées par ces deux cytokines (M. David et al., 2001; Omori-Miyake et al., 2014; Schindler et al., 2007).

L'analyse de la signalisation des voies MAPKs p38 (Thr180/Tyr182) et ERK1/2 (Thr202/Tyr204) en cas de déplétion du cholestérol montre une activation immédiate pour ces deux voies qui semble davantage soutenue pour la MAPK ERK1/2. Ces résultats ne permettent cependant pas de démontrer une activation des récepteurs des interleukines IL-4 et IL-13 suite à la perturbation des microdomaines. En effet, dans des études précédentes, une phosphorylation des MAPKs p38 et ERK1/2 a été mise en relation avec une activation de EGFR consécutive à la perturbation des microdomaines lipidiques dans des kératinocytes confluents (Lambert et al., 2008; Lambert et al., 2006).

Cette mise en évidence de la phosphorylation des MAPKs p38 et ERK1/2 en cas de déplétion du cholestérol membranaire se révèle toutefois être intéressante, car ces voies sont également rapportées activées par les IL-4 et IL-13. La combinaison de la déplétion du cholestérol et de la stimulation des kératinocytes par ces deux cytokines pourrait alors affecter d'autant plus l'activation de ces voies et leurs conséquences. Ces voies communes pourraient alors être éventuellement impliquées dans l'accentuation des effets sur l'altération de la barrière que nous voulons tester comme hypothèse.

L'étude de la régulation des récepteurs aux IL-4 et IL-13, dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques, suggère que l'effet synergique de la déplétion du cholestérol combinée à la stimulation aux IL-4, IL-13, IL-25 observé en RHE ne résulte, ni d'une activation significative de la signalisation JAK-STAT6, ni d'une expression accrue de IL-13R $\alpha$ 1 et IL-4R $\alpha$  en condition de déplétion du cholestérol. Néanmoins, la perturbation des microdomaines lipidiques seule a induit une augmentation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 ainsi qu'une possible relocalisation du récepteur IL-4R $\alpha$ .

Il apparait que le modèle en monocouches présente des limitations à son utilisation pour la compréhension de phénomènes observés en RHE. Notre étude utilisant ce modèle plus simple a mis en évidence un manque de reproductibilité de l'expression de TSLP, cytokine majeure de la DA contribuant à la mise en place de la réponse Th2, sur base de laquelle les conditions

de traitement avec la M $\beta$ CD avaient été établies. De plus, la perte de l'effet de la combinaison des traitements tel qu'observé en RHE sur l'expression de la filaggrine et de la loricrine, gènes impliqués dans la différenciation, et sur l'expression de NELL2, gène marqueur de la DA, constitue un obstacle majeur à la poursuite de l'étude de l'expression et de la signalisation des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans ce modèle. Seul CA2, un autre gène marqueur de la DA, conserve le même profil d'expression que celui observé en RHE, reflétant éventuellement l'implication de mécanismes de régulation différents que ceux impliqués dans la régulation de l'expression de la filaggrine, loricrine et NELL2. Ceci soulève une complexité de l'association des effets entre la déplétion du cholestérol et la stimulation aux IL-4, IL-13 et IL-25. Le processus de différenciation pourrait expliquer en partie la différence de régulation des gènes marqueurs de DA observée entre les modèles en monocouches et en RHE. Les cellules entrent en différenciation en passant du stade de confluence, stade à partir duquel la prolifération cellulaire est inhibée et le processus de différenciation terminale enclenché, à confluence plus 2 jours. Contrairement au modèle en monocouches, les épidermes reconstruits présentent peu de variations de l'expression de leurs marqueurs de différenciation entre le 11<sup>ème</sup> jour et le 13<sup>ème</sup> de reconstruction, un équilibre entre les processus de prolifération et de différenciation étant mis en place. Cumulée aux effets de la différenciation, l'activation cellulaire induite par la déplétion du cholestérol pourrait mener à cette différence de régulation de l'expression de gènes et en particulier à l'augmentation de l'expression de la filaggrine et loricrine lors de la combinaison des traitements en comparaison à la stimulation par les interleukines.

En conséquence, notre démarche pour l'étude de la régulation des récepteurs de IL-4 ou d'IL-13 a dû être adaptée et s'est orientée sur l'utilisation du modèle d'épiderme reconstruit.

## **2 Étude de la régulation des récepteurs des IL-4 et IL-13 dans des épidermes reconstruits humains**

Dans ce modèle en RHE, nous avons investigué les effets de la déplétion du cholestérol membranaire, de la stimulation aux interleukines associées à la réponse Th2 (IL-4, IL-13, IL-25) ainsi que de la combinaison de ces traitements, sur la régulation des récepteurs.

**L'analyse de l'expression des récepteurs** s'est portée en ARNm sur les chaînes IL-13R $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2. L'expression de la chaîne  $\alpha$ 2 en réponse aux interleukines, après déplétion préalable ou non du cholestérol membranaire, augmente graduellement pour des durées de stimulation de 2 h, 4 h et 6 h et se montre être la plus prononcée après 48 h de stimulation aux interleukines. Les épidermes reconstruits après avoir été uniquement déplétés du cholestérol montrent une augmentation progressive de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 pour des temps de récupération inférieurs à 48 h, période de récupération pour laquelle une absence d'augmentation de son expression est observée. Ce profil d'expression semble se rapporter à ce qui est observé dans des kératinocytes confluent déplétés du cholestérol où une expression élevée de ce récepteur est observée après 4 h de récupération pour diminuer fortement après 24 h de récupération. Cependant, les effets de la déplétion du cholestérol à 4 h de récupération semblent impacter davantage les cellules dans le modèle de monocouches. L'induction de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 est de +270 fois en monocouches alors qu'en RHE, elle n'est que de +12 fois. Ceci laisse présager que l'activation cellulaire en RHE suite à la déplétion du cholestérol pourrait soit être plus faible que celle rencontrée dans les kératinocytes en monocouches ou soit présenter un effet retard comme le laisse envisager son induction à 6h de récupération (+63 fois).

En ce qui concerne l'expression de la chaîne IL-13R $\alpha$ 1, une tendance à l'augmentation de son expression est observée en réponse à la déplétion du cholestérol membranaire suivie ou non

de la stimulation par les interleukines IL-4, IL-13, IL-25. Cette tendance est retrouvée quelle que soit la période de récupération/stimulation et semble résulter davantage de l'effet de la déplétion du cholestérol.

À la différence de la régulation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2, l'expression de IL-13R $\alpha$ 1 ne dépendrait pas de la stimulation par les interleukines seules, ce qui rejoint une étude portée sur les kératinocytes humains de la lignée cellulaire HaCaT, où la stimulation des cellules par les IL-4 et IL-13 entraîne l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 et non de la chaîne  $\alpha$ 1 (M. David et al., 2001). Ceci pourrait mettre en évidence l'implication de mécanismes différents de régulation de l'expression de ces chaînes. La différence de niveau d'expression de ces chaînes de récepteurs dans les cellules saines constitue une autre de leur particularité. Contrairement à la chaîne  $\alpha$ 1, la chaîne IL-13R $\alpha$ 2 semble peu exprimée par les cellules saines reflétant des fonctions différentes de ces deux récepteurs. L'expression de IL-13R $\alpha$ 2 serait plutôt induite afin de faire face à des stress et agir comme potentiel mécanisme de régulation de la signalisation des IL-4 et IL-13.

**L'analyse de la localisation de la chaîne IL-4R $\alpha$**  montre que ce récepteur semble davantage se localiser dans les couches basale et épineuse de l'épiderme *in vitro* et *in vivo*. La déplétion du cholestérol ne semble pas induire de relocalisation du récepteur au sein des couches de l'épiderme reconstruit. Une étude portée sur la localisation de IL-4R $\alpha$  au sein de différents tissus a relevé une localisation plus marquée de ce récepteur dans la couche basale de l'épiderme (Akaiwa et al., 2001; Prens et al., 1996). Il faudrait donc reproduire cette expérience afin de vérifier nos résultats. La présence d'un marquage plus marqué au niveau des couches inférieures de l'épiderme pour ce récepteur pourrait éventuellement s'expliquer par la présence des IL-4 et IL-13 sécrétées par les cellules immunitaires au sein du derme dans un contexte inflammatoire.

**L'analyse de la signalisation de IL-4R et IL-13R** pour les différents traitements, déplétion du cholestérol et/ou stimulation par les IL-4, IL-13 et IL-25, a montré une phosphorylation élevée et constante de STAT6, quelle que soit la durée de stimulation par les IL-4, IL-13 et IL-25. Cette activation de STAT6 peut être attribuée aux effets des IL-4 et IL-13 comme cela a été rapporté dans la littérature (Kamsteeg et al., 2007; McCormick & Heller, 2015) et montré en monocouches par l'absence d'activation de STAT6 en cas de stimulation par IL-25 seule.

L'activation constante de STAT6 mise en évidence sous stimulation continue aux IL-4, IL-13, IL-25 rejoint les résultats d'une étude de Andrews et al. en 2002. Dans celle-ci, une stimulation continue de cellules B murines par IL-4 est associée à un niveau maximal d'activation de STAT6, maintenu indéfiniment dans le noyau. Cette activation n'est pas dépendante d'une synthèse *de novo* de protéine ni associée à une dégradation des protéines, suggérant la présence d'un cycle d'activation, désactivation et réactivation des protéines STAT. Cette réactivation serait permise par les protéines JAK (R. P. Andrews, Ericksen, Cunningham, Daines, & Hershey, 2002).

Sur base de nos résultats, l'absence de détection d'un plus grand nombre de STAT6 phosphorylée dans le cas de la combinaison des traitements, en comparaison à la stimulation aux interleukines seules, suggérerait que le mécanisme impliqué dans l'exacerbation des effets sur l'altération de la barrière épidermique ne passerait pas par une augmentation de l'activation de STAT6 en réponse à la déplétion du cholestérol.

Cependant, il est possible que la visualisation d'une activation plus importante de STAT6, en réponse à la combinaison des traitements soit cachée derrière les temps de récupération/stimulation choisis. La déplétion du cholestérol pourrait partiellement activer

STAT6 pour des temps plus courts de récupération. En effet une régulation rapide de l'activation de STAT6 est rapportée dans la littérature et dans nos résultats en monocouches où une faible phosphorylation est observée pour des temps compris entre 0 et 1h de récupération. La déplétion du cholestérol est d'autant plus susceptible d'activer STAT6 qu'il a été rapporté que l'EGFR est d'une part, activé lors de ce stress cellulaire et d'autre part, montré induire l'activation de protéines STATs, en particulier STAT3 dans des cancers du sein et STAT6 dans des glioblastomes (Bowman, Garcia, Turkson, & Jove, 2000; Merk, Owens, Lopes, Silva, & Hussaini, 2011).

L'étude de la signalisation de la MAPK p38 ne montre pas de véritables variations de la phosphorylation de cette kinase selon la nature et la durée des traitements en RHE. Ces résultats méritent toutefois d'être confirmés car des variations perceptibles ont été montrées pour des kératinocytes confluents déplétés du cholestérol membranaire. La MAPK ERK1/2 montre quant à elle une augmentation de son activation en cas de déplétion du cholestérol et plus particulièrement après 2h de récupération. Cette amélioration de la phosphorylation semble se retrouver dans les RHE déplétés du cholestérol et stimulés par les interleukines.

Les signalisations propres à la stimulation via les interleukines et suite à la déplétion du cholestérol membranaire peuvent être mises en relation avec les profils d'expression de leurs récepteurs, ainsi que des gènes marqueurs de DA montrés différents selon la nature du stress induit aux RHE.

La déplétion du cholestérol induit un phénotype activé transitoire des kératinocytes, qui s'explique par leur capacité à synthétiser le cholestérol et se traduit en des activations temporaires des voies de signalisation telles que rencontrées dans nos résultats pour ERK1/2. Ceci pourrait également expliquer l'augmentation transitoire de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2. La stimulation aux interleukines durant 48h, induisant une activation maintenue de STAT6, permettrait de prolonger cette augmentation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 et de la maintenir jusqu'à 48h de stimulation.

L'activation de STAT6 serait responsable de l'augmentation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 suite à la stimulation aux interleukines alors que ERK1/2 contribuerait à l'augmentation de l'expression de cette chaîne pour les RHE déplétés du cholestérol, éventuellement par le biais de l'activation de EGFR comme rapporté dans des cellules de glioblastome (Hu, Gibo, & Debinski, 2005). La contribution à la fois de l'activation des voies STAT6 et de ERK1/2 pourrait donc expliquer l'amélioration de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 dans le cas de la combinaison des traitements.

Les résultats obtenus suite à l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 par PD 98059 montrent une diminution de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 dans le cas de la combinaison des traitements mais ne montrent pas d'altération de son expression dans le cas de la stimulation via les interleukines seules, appuyant l'hypothèse de l'implication de voies différentes dans les effets observés dans le cas de la combinaison des traitements.

Dans une étude, le promoteur de *IL13RA2* a été en partie caractérisé et des sites de liaison au facteur de transcription STAT6 et d'AP-1, un facteur de transcription en aval de l'activation de la kinase ERK1/2, ont été mis en évidence (M. D. David et al., 2003).

D'autre part, la contribution éventuelle de ERK1/2 dans l'exacerbation des effets observés dans les RHE déplétés du cholestérol et stimulés par les IL-4, IL-13 et IL-25 semblerait se confirmer lors de l'inhibition de sa phosphorylation par les kinases MEK. En effet, cette inhibition semble atténuer l'expression de CA2 lors de la combinaison des traitements. Par contre, l'activation de ERK1/2 paraît être moins impliquée dans l'accentuation des effets de la combinaison sur l'expression de la filaggrine et la loricerine, ce qui, implicitement, pourrait suggérer que l'activation de STAT6 mise en évidence dans nos conditions serait davantage responsable de l'amélioration des effets relatifs à la diminution de l'expression de la



filaggrine et loricrine. L'activation de STAT6 a été rapportée comme étant capable de diminuer l'expression de la loricrine dans un contexte de stimulation par IL-4 et IL-13 chez des kératinocytes humains (B. E. Kim et al., 2008) et de la filaggrine chez des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement activée de STAT6, suite à une mutation gain de fonction (souris STAT6VT Val547Ala/Thr548Ala) (Sehra et al., 2010). L'inhibition de la phosphorylation de STAT6 permettrait de confirmer son implication dans la dérégulation de la différenciation, et plus particulièrement de l'expression de la filaggrine et de la loricrine.

Une plus grande activation de la voie de transduction du signal JAK-STAT6 pourrait être rencontrée dans nos conditions de traitements, non pas par une augmentation de la phosphorylation STAT6, mais par une amélioration de sa fonction de facteur de transcription. En effet, des modifications post-traductionnelles peuvent intervenir dans la régulation de la fonction de STAT6. Les kératinocytes activés en réponse à la déplétion du cholestérol sont susceptibles d'activer des voies de signalisation impliquant des sérine/thréonine kinases telles que la MAPK p38. Cette MAPK activée permet, par le biais de la phosphorylation de résidu sérine (S756) au niveau du domaine de transactivation de STAT6, d'améliorer l'activité de transcription de STAT6 (Hebenstreit et al., 2006). Ceci a été montré notamment dans le cas de l'expression de gènes en réponse à IL-4 dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (Pesu, Aittomaki, Takaluoma, Lagerstedt, & Silvennoinen, 2002). De manière intéressante, dans nos résultats en monocouches, la combinaison de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par IL-4 seule montre une meilleure activation de la MAPK p38.

Il apparaît clairement que les interleukines IL-4 et IL-13, par le biais de leur récepteur, induisent des effets d'une manière JAK-STAT6 dépendante, confirmant son rôle clé dans la signalisation de ces deux cytokines. Les MAPKs p38 et ERK1/2 sont susceptibles de contribuer à l'accentuation des effets observés en RHE activés par la déplétion du cholestérol et la stimulation aux interleukines associées à la réponse Th2.

Il est probable que les mécanismes sous-jacents à l'exacerbation de ces effets implique d'autres voies de signalisation telles que les voies JNK et PI3K/Akt. En effet, ces voies ont déjà été montrées être associées à la déplétion du cholestérol ainsi qu'à la stimulation aux IL-4 ou IL-13 (Hashimoto, Gon, Takeshita, Maruoka, & Horie, 2001; S. Kim et al., 2007; Lambert et al., 2008).

D'autre part, l'abondance relative des trois chaînes de récepteur IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 et leur affinité réciproque ainsi que pour leur ligand IL-4 et IL-13 détermine la sensibilité des cellules à ces deux cytokines. Selon le niveau d'expression de ces chaînes, les réponses aux IL-4 et IL-13 sont modulées en faveur de l'une ou l'autre des interleukines (Junttila et al., 2008). En raison de la très haute affinité entre IL-4 et IL-4R $\alpha$ , la capture de cette cytokine devrait être permise à une très faible concentration. Cependant, la formation du complexe de signalisation IL-4/IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 est relativement inefficace compte tenu de la faible affinité de IL-4/IL-4R $\alpha$  pour IL-13R $\alpha$ 1. Ainsi, une concentration insuffisante des chaînes IL-13R $\alpha$ 1 se révèle être limitante pour la signalisation de IL-4. Au contraire, IL-13 lie IL-13R $\alpha$ 1 avec une faible affinité. Des concentrations élevées d'IL-13 sont donc nécessaires pour assembler le complexe IL-13/IL-13R $\alpha$ 1. Cependant, la formation du complexe de signalisation IL-13/IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$  est relativement efficace en raison de l'affinité élevée qui associe les deux chaînes de récepteur. Dès lors, un grand nombre de complexes de signalisation IL-13/IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$  peut être produit si une quantité suffisamment grande d'IL-13 peut être présente (Junttila et al., 2008).

La liaison de haute affinité entre IL-13 et IL-13R $\alpha$ 2 permettrait de libérer IL-13R $\alpha$ 1 pour la rendre disponible pour la formation du complexe de signalisation de IL-4. En conséquence la

modulation de l'expression de IL-13R $\alpha$ 2 est susceptible de réguler la signalisation associée aux IL-4 et IL-13 (Daines & Hershey, 2002).

Sur base de nos résultats, il apparaît que l'expression de la chaîne IL-13R $\alpha$ 2 est la plus élevée suite à la combinaison des traitements. Ceci laisse à penser que la signalisation associée à IL-4 serait davantage favorisée suite à la combinaison des traitements. À partir de données de la littérature, IL-4 semblerait davantage être impliquée dans la diminution de l'expression de la filaggrine, loricrine et involucrine, en comparaison avec l'IL-13 (B. E. Kim et al., 2008; Sehra et al., 2010). Il est en effet montré que la neutralisation de IL-4 ou de IL-13 endogènes à l'aide d'anticorps permet d'augmenter l'expression de la filaggrine et ce de manière significative lorsque IL-4 est neutralisée, soulignant alors un effet plus prononcé de IL-4 sur la diminution de la filaggrine chez des souris présentant une forme de STAT6 activée en permanence (Sehra et al., 2010). L'étude de Kim et al (2008) est quant à elle portée sur des kératinocytes humains et a relevé que IL-4 seule (loricrine  $2,23 \pm 0,81$  ; involucrine  $0,72 \pm 0,05$ ) semble induire davantage d'effets que IL-13 seule (loricrine  $3,23 \pm 0,54$  ; involucrine  $1,11 \pm 0,06$ ) ou que leur combinaison IL-4/IL-13 (loricrine  $2,80 \pm 0,90$  ; involucrine  $0,88 \pm 0,10$ ) (B. E. Kim et al., 2008).

L'induction de l'expression de la chaîne  $\alpha$ 2 pourrait constituer un mécanisme de régulation fine mis en place par les kératinocytes afin de moduler les réponses aux IL-4 et IL-13.

Bien que IL-13R $\alpha$ 2 pourrait agir comme un récepteur leurre, en liant avec une haute affinité IL-13 et neutralisant ses effets, il n'est pas exclu qu'il contribue aux effets des IL-13. En effet, dans la littérature, il a été rapporté une signalisation associée au complexe IL-13/IL-13R $\alpha$ 2.

La signalisation de IL-13 par le biais du récepteur IL-13R $\alpha$ 2 au niveau de macrophages induit l'activation du promoteur de *TGFB1* d'une manière STAT6 indépendante mais Activator Protein-1 AP-1 (c-Jun/Fra-2) dépendante. La production de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> par le biais de ce récepteur contribue au développement de la fibrose pulmonaire (Fichtner-Feigl et al., 2006). La signalisation de IL-13 par cette chaîne de récepteur est également rapportée contribuer au développement de la fibrose intestinale dans un modèle de colite chronique (Fichtner-Feigl et al., 2008) ainsi que de l'inflammation des voies respiratoires dans un modèle murin d'asthme allergique (W. Chen et al., 2013).

Les concentrations en interleukines ainsi que le ratio entre les expressions des différentes chaînes seraient alors des facteurs déterminants dans la compréhension des effets améliorés observés suite à la combinaison des traitements aux interleukines et à la M $\beta$ CD.

Malgré la mise en évidence de l'augmentation de l'expression de ces chaînes au niveau transcriptionnel, il n'est pas certain que celle-ci se traduise en une augmentation de l'expression des protéines correspondantes, et plus particulièrement des protéines membranaires. Il conviendrait dès lors de mettre au point nos outils pour analyser la synthèse *de novo* de ces chaînes en Western blot et également leur éventuelle signalisation afin d'évaluer leur implication dans l'amélioration des effets observés lors de la combinaison des traitements. L'analyse de la signalisation devrait dès lors s'opérer à des temps de récupération/stimulation supérieurs à 24h.

Notre étude visant à comprendre des phénomènes observés dans un modèle expérimental destiné à mimer les caractéristiques types de la DA, il est intéressant de mettre en relation l'expression des récepteurs aux IL-4 et IL-13 dans ce contexte de pathologie inflammatoire. Ainsi, la surexpression de IL-13R $\alpha$ 2 mise en évidence au cours de notre recherche constitue une caractéristique de la DA (Lu et al., 2009). Cette expression pourrait être associée au passage de la phase aiguë (Th2) à la phase chronique (Th1) de cette pathologie. IL-13R $\alpha$ 2, combinée à l'activation de EGFR et l'expression de PLA $\alpha$ /PLA $\beta$  et d'HB-EGF retrouvées dans les réponses cellulaires associées à la déplétion du cholestérol (Lambert et al., 2006;

Mathay et al., 2011), pourraient participer aux processus d'hyperplasie épidermique et de fibrose observés lors de la phase chronique de la maladie (Pastore et al., 2008). PLAUR activé a été rapporté initier la signalisation de l'EGFR (D. Liu, Aguirre Ghiso, Estrada, & Ossowski, 2002) à l'instar de HB-EGF (Pastore et al., 2008). L'expression de IL-13R $\alpha$ 1 ne présente pas de variations significatives dans les épidermes reconstruits suite aux différents traitements à l'instar de ce qui semble se retrouver dans la peau lésionnelle de patients atteints de DA (Cancino-Diaz et al., 2002).

Un modèle d'épiderme reconstruit à partir de kératinocytes issus de peau lésionnelle de patients atteints de cette pathologie inflammatoire permettrait d'obtenir des données relatives à la régulation des récepteurs aux IL-4 et IL-13 telle qu'observée dans la DA.

### **3 Conclusion et perspectives**

Il a été constaté au cours de cette recherche que les phénomènes observés dans un modèle complexe stratifié d'épiderme reconstruit ne sont pas nécessairement transposables dans un modèle plus simple de kératinocytes en monocouches. Dans notre cas, le modèle en RHE constitue le modèle de prédilection pour l'analyse de l'expression et de la signalisation de IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 alors que le modèle en monocouches nous permet l'étude de phénomènes cellulaires qui ne sont pas analysables dans un tissu tels que la localisation subcellulaire des récepteurs et de leur potentielle localisation au sein des microdomaines lipidiques.

Notre étude portant sur la régulation des récepteurs aux IL-4 et IL-13, dans un contexte de perturbation des microdomaines lipidiques, indique que l'équilibre entre les expressions des différentes chaînes de récepteur, rapporté comme critique pour la régulation de la signalisation des IL-4 et IL-13, paraît être affecté par la déplétion du cholestérol et la stimulation aux interleukines.

La surexpression de IL-13R $\alpha$ 2, rapportée comme étant une caractéristique de la DA, est montrée suite à la déplétion du cholestérol et à la stimulation par des interleukines liées à la réponse immunitaire Th2. Cette surexpression pourrait être liée à des voies de signalisation différentes selon la nature de la stimulation des kératinocytes. Cependant, son implication dans les effets synergiques observés sur l'altération de la barrière épidermique n'a pas été établie.

La perturbation des microdomaines lipidiques ne paraît pas activer le récepteur IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 indépendamment du ligand mais pourrait, par une éventuelle relocalisation du récepteur IL-4R $\alpha$  au sein de la cellule, participer à la modulation de la signalisation en agissant sur la concentration des chaînes de récepteur disponibles.

Notre étude soulève l'importance des IL-4 et -13, par le biais de leurs récepteurs et signalisation associée, en particulier la voie JAK-STAT6, dans la physiologie des kératinocytes et dans la dérégulation de la différenciation des kératinocytes. L'activation cellulaire résultant de la déplétion du cholestérol membranaire potentialiserait les effets des interleukines sur l'altération de l'homéostasie épidermique par le biais de voies de signalisation distinctes de la voie JAK-STAT6.

En conclusion, des études ultérieures sont nécessaires afin d'élucider les mécanismes détaillés gouvernant les effets synergiques de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par des cytokines liées à la réponse immunitaire Th2.

Pour cela, il apparaît avant tout nécessaire d'optimiser les outils d'analyse à notre disposition. Ainsi, il est important de pouvoir valider la spécificité de l'anticorps IL-4R $\alpha$ , en envisageant

éventuellement de transfecter des cellules à l'aide de siRNA spécifiques de la séquence codante en ARN de cette chaîne de récepteur. Des cellules déplétées de ce récepteur seraient ainsi obtenues et constitueraient un contrôle négatif de l'expression de IL-4R $\alpha$ .

Par ailleurs, déterminer l'éventuelle présence des récepteurs aux interleukines au sein des microdomaines lipidiques serait une information clé dans la compréhension de leur régulation dans un contexte de perturbation des microdomaines. Il conviendrait d'adapter notre procédure d'immunomarquage afin d'éviter les étapes critiques au maintien de l'insertion en membrane de la sonde BODIPY-SM.

La déplétion du cholestérol pourrait éventuellement affecter les affinités existant entre le ligand et sa chaîne de récepteur ou entre les deux chaînes de récepteur composant le complexe de signalisation. Compte tenu de l'importance de ces affinités dans la modulation des réponses aux IL-4 et IL-13, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la perturbation des microdomaines sur celles-ci mais également sur la concentration locale de ces chaînes au sein de la membrane.

La perturbation des microdomaines est susceptible d'intervenir dans un processus de relocalisation du récepteur. Une analyse plus approfondie de celle-ci pourrait compléter nos premiers résultats relatifs à l'internalisation de IL-4R $\alpha$ . Des durées de traitements plus courts à la M $\beta$ CD, une analyse d'autres marqueurs de la voie d'endocytose ainsi que l'utilisation d'inhibiteur de la formation de vésicules d'endocytose pourraient être réalisées afin d'évaluer l'importance de la relocalisation du récepteur pour la transduction du signal de IL-4R/IL-13R. Une analyse de la phosphorylation des kinases JAK1 et JAK2/TYK2, facteurs clés dans l'induction de la transduction du signal par la voie JAK-STAT6 et dans le maintien de l'activation constante de STAT6, pourrait apporter de nouveaux éléments de réponse à notre étude. L'inhibition de l'activation de STAT6, de la MAPK p38 et de ERK1/2 permettrait de déterminer leur implication respective dans la mise en place d'un phénotype type de DA. La neutralisation de EGFR pourrait également être envisagée, son activation ligand dépendante étant rapportée suite à la perturbation des microdomaines lipidiques (Giltaire et al., 2011).

La neutralisation de la chaîne IL-13R $\alpha$ 2 pourrait apporter des indications quant à l'implication de l'expression de cette chaîne dans la signalisation de IL-13. Il serait également intéressant de pouvoir développer des RHE déficients pour les différentes chaînes de récepteurs à l'aide de shRNA propre à leur séquence, et plus particulièrement à l'IL-13R $\alpha$ 2. Ces deux procédures permettraient d'obtenir des informations quant à sa fonction inhibitrice ou effectrice dans la signalisation de IL-13.

**La matrice extracellulaire** pourrait jouer un rôle important dans l'homéostasie de l'épiderme et se révèle une cible attractive dans le cadre de notre étude.

L'acide hyaluronique (HA) et l'une de ses synthases, la HAS3, pourraient, en interaction avec les IL-4 et IL-13 et la déplétion du cholestérol, intervenir dans l'altération de la barrière épidermique telle qu'observée après la combinaison des traitements. Dans un contexte de pathologie inflammatoire, une augmentation de la présence de HA est détectée au sein des épidermes lésionnels de patients atteints de DA et ce, en corrélation avec la surexpression de la HAS3. L'expression de la HAS3, rapportée importante dans les pathologies inflammatoires, pourrait être liée à la présence d'HB-EGF (Malaisse et al., 2014). De manière intéressante, les kératinocytes déplétés du cholestérol sont associés à une surexpression d'HB-EGF comme montrée dans nos résultats et dans la littérature (De Vuyst et al., 2015; Mathay et al., 2008; Mathay et al., 2011). La stimulation des kératinocytes par les IL-4 ou IL-13 se traduit par une augmentation de l'expression de la HAS3 et de la production de HA. Cette stimulation aux interleukines semble également contribuer à la diminution de l'expression de la E-cadhérine, protéines des jonctions d'adhérence, et en particulier dans un milieu riche en calcium (1,2 mM) (Ohtani et al., 2009), condition rencontrée lors de la reconstruction de

l'épiderme humain (1,44 mM). Cette diminution de l'expression de la E-cadhérine, associée à l'accumulation de l'HA, contribuerait à l'apparition de la spongiose. La surexpression de la HAS3, retrouvée induite lors de la combinaison des traitements dans les RHE, pourrait être éventuellement mise en corrélation avec l'observation de la spongiose et de l'altération de la barrière épidermique (De Vuyst, en préparation).

Un rôle des métalloprotéinases matricielles (MMP), en particulier la MMP-9, pourrait constituer une autre explication potentielle des effets synergiques observés lors de la déplétion du cholestérol et de la stimulation par les interleukines type Th2. Les MMP sont connues pour contribuer au remodelage tissulaire et pour favoriser l'infiltration des cellules inflammatoires par leur capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire (Devillers, van Toorenenbergen, Klein Heerenbrink, Muldert, & Oranje, 2007; S. Kim et al., 2007; Purwar, Kraus, Werfel, & Wittmann, 2008). Des résultats de précédentes investigations indiquent que l'expression de la MMP-9, une gélatinase/collagénase de type IV, est augmentée après déplétion du cholestérol (S. Kim et al., 2007; Mathay et al., 2011) ainsi qu'après stimulation de kératinocytes humains par IL-13 (Purwar et al., 2008). MMP-9 et IL-13 sont montrées surexprimées dans les phases aiguës de l'inflammation de la peau, telles que rencontrées dans la DA (Devillers et al., 2007; Purwar et al., 2008). L'investigation des voies de signalisation et de la régulation de la MMP-9 pourrait être porteur d'informations.

## **Références**

- Akaiwa, M., Yu, B., Umeshita-Suyama, R., Terada, N., Suto, H., Koga, T., . . . Izuhara, K. (2001). Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine*, 13(2), 75-84. doi: 10.1006/cyto.2000.0814
- Akiyama, M. (2010). FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics. *Br J Dermatol*, 162(3), 472-477. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09582.x
- Albanesi, C., Fairchild, H. R., Madonna, S., Scarponi, C., De Pita, O., Leung, D. Y., & Howell, M. D. (2007). IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol*, 179(2), 984-992.
- Ando, H., Niki, Y., Ito, M., Akiyama, K., Matsui, M. S., Yarosh, D. B., & Ichihashi, M. (2012). Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J Invest Dermatol*, 132(4), 1222-1229. doi: 10.1038/jid.2011.413
- Andrews, A. L., Holloway, J. W., Holgate, S. T., & Davies, D. E. (2006). IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. *J Immunol*, 176(12), 7456-7461.
- Andrews, R. P., Ericksen, M. B., Cunningham, C. M., Daines, M. O., & Hershey, G. K. (2002). Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *J Biol Chem*, 277(39), 36563-36569. doi: 10.1074/jbc.M200986200
- Arima, K., Umeshita-Suyama, R., Sakata, Y., Akaiwa, M., Mao, X. Q., Enomoto, T., . . . Izuhara, K. (2002). Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 109(6), 980-987.
- Assirelli, E., Pulsatelli, L., Dolzani, P., Platano, D., Olivotto, E., Filardo, G., . . . Meliconi, R. (2014). Human osteoarthritic cartilage shows reduced in vivo expression of IL-4, a chondroprotective cytokine that differentially modulates IL-1beta-stimulated production of chemokines and matrix-degrading enzymes in vitro. *PLoS One*, 9(5), e96925. doi: 10.1371/journal.pone.0096925
- Barnes, K. C. (2010). An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol*, 125(1), 16-29 e11-11; quiz 30-11. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.008
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 30(3), 257-262. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
- Bieber, T. (2010). Atopic dermatitis. *Ann Dermatol*, 22(2), 125-137. doi: 10.5021/ad.2010.22.2.125
- Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. (2011). Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev*, 242(1), 233-246. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01027.x
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21), 2474-2488. doi: 10.1038/sj.onc.1203527
- Brandt, E. B., & Sivaprasad, U. (2011). Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol*, 2(3). doi: 10.4172/2155-9899.1000110
- Brown, S. J., & McLean, W. H. (2012). One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 2), 751-762. doi: 10.1038/jid.2011.393
- Cancino-Diaz, J. C., Reyes-Maldonado, E., Banuelos-Panuco, C. A., Jimenes-Zamudio, L., Garcia-latorr, E., Leon-Dorantes, G., . . . Cancino-Diaz, M. E. (2002). Interleukin-13

- receptor in psoriatic keratinocytes: overexpression of the mRNA and underexpression of the protein. *Journal of Investigative Dermatology*, 119, 1114-1120.
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4), 328-340. doi: 10.1038/nrm1619
- Carquin, M., Pollet, H., Veiga-da-Cunha, M., Cominelli, A., Van Der Smissen, P., N'Kuli, F., . . . Tyteca, D. (2014). Endogenous sphingomyelin segregates into submicrometric domains in the living erythrocyte membrane. *J Lipid Res*, 55(7), 1331-1342. doi: 10.1194/jlr.M048538
- Chatila, T. A. (2004). Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med*, 10(10), 493-499. doi: 10.1016/j.molmed.2004.08.004
- Chen, H. C., & Reich, N. C. (2010). Live cell imaging reveals continuous STAT6 nuclear trafficking. *J Immunol*, 185(1), 64-70. doi: 10.4049/jimmunol.0903323
- Chen, W., Sivaprasad, U., Gibson, A. M., Ericksen, M. B., Cunningham, C. M., Bass, S. A., . . . Khurana Hershey, G. K. (2013). IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 132(4), 951-958 e951-956. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.016
- Clark, R., & Kupper, T. (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*, 125(4), 629-637. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x
- Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., . . . Ward, S. J. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129(8), 1892-1908. doi: 10.1038/jid.2009.133
- D'Auria, L., Van der Smissen, P., Bruyneel, F., Courtoy, P. J., & Tyteca, D. (2011). Segregation of fluorescent membrane lipids into distinct micrometric domains: evidence for phase compartmentation of natural lipids? *PLoS One*, 6(2), e17021. doi: 10.1371/journal.pone.0017021
- Daines, M. O., & Hershey, G. K. (2002). A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha -2 and their rapid mobilization by interferon-gamma. *J Biol Chem*, 277(12), 10387-10393. doi: 10.1074/jbc.M108109200
- Danso, M. O., van Drongelen, V., Mulder, A., van Esch, J., Scott, H., van Smeden, J., . . . Bouwstra, J. A. (2014). TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J Invest Dermatol*, 134(7), 1941-1950. doi: 10.1038/jid.2014.83
- David, M., Ford, D., Bertoglio, J., Maizel, A. L., & Pierre, J. (2001). Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways. *Oncogene*, 20(46), 6660-6668. doi: 10.1038/sj.onc.1204629
- David, M. D., Bertoglio, J., & Pierre, J. (2003). Functional characterization of IL-13 receptor alpha2 gene promoter: a critical role of the transcription factor STAT6 for regulated expression. *Oncogene*, 22(22), 3386-3394. doi: 10.1038/sj.onc.1206352
- De Benedetto, A., Agnihothri, R., McGirt, L. Y., Bankova, L. G., & Beck, L. A. (2009). Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol*, 129(1), 14-30. doi: 10.1038/jid.2008.259
- De Vuyst, E., Giltaire, S., Lambert de Rouvroit, C., Chretien, A., Salmon, M., & Poumay, Y. (2015). The activation of cultured keratinocytes by cholesterol depletion during reconstruction of a human epidermis is reminiscent of monolayer cultures. *Arch Dermatol Res*, 307(4), 309-318. doi: 10.1007/s00403-015-1537-3
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*, 180(3), 451-458. doi: 10.1083/jcb.200709098

- Devillers, A. C., van Toorenenbergen, A. W., Klein Heerenbrink, G. J., Muldert, P. G., & Oranje, A. P. (2007). Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase-9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Clin Exp Dermatol*, 32(3), 311-313. doi: 10.1111/j.1365-2230.2007.02378.x
- Dhingra, N., Gulati, N., & Guttman-Yassky, E. (2013). Mechanisms of contact sensitization offer insights into the role of barrier defects vs. intrinsic immune abnormalities as drivers of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 133(10), 2311-2314. doi: 10.1038/jid.2013.239
- Di Cesare, A., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2008). A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? *J Invest Dermatol*, 128(11), 2569-2571. doi: 10.1038/jid.2008.283
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., & Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*, 124(3), 481-492. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23627.x
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., & Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3471-3480. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010
- Elias, P. M. (2014). Lipid abnormalities and lipid-based repair strategies in atopic dermatitis. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), 323-330. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.10.001
- Elias, P. M., & Wakefield, J. S. (2014). Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 134(4), 781-791 e781. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.048
- Elmariah, S. B., & Lerner, E. A. (2013). The missing link between itch and inflammation in atopic dermatitis. *Cell*, 155(2), 267-269. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.038
- Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068), 578-580. doi: 10.1038/nature04394
- Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), 280-294. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.11.007
- Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K., & Kitani, A. (2006). IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med*, 12(1), 99-106. doi: 10.1038/nm1332
- Fichtner-Feigl, S., Young, C. A., Kitani, A., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., & Strober, W. (2008). IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology*, 135(6), 2003-2013, 2013 e2001-2007. doi: 10.1053/j.gastro.2008.08.055
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., . . . Rennick, D. M. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 15(6), 985-995.
- Frankart, A., Malaisse, J., De Vuyst, E., Minner, F., de Rouvrouit, C. L., & Poumay, Y. (2012). Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol*, 21(11), 871-875. doi: 10.1111/exd.12020
- Freinkel, R., & Woodley, D. (2001). *The biology of the skin*. New York; London: The Parthenon Publishing Group.
- Friedrich, K., Kammer, W., Erhardt, I., Brandlein, S., Arnold, S., & Sebald, W. (1999). The two subunits of the interleukin-4 receptor mediate independent and distinct patterns of ligand endocytosis. *Eur J Biochem*, 265(1), 457-465.
- Gandhi, H., Worch, R., Kurgonaite, K., Hintersteiner, M., Schwill, P., Bokel, C., & Weidemann, T. (2014). Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells. *Biophys J*, 107(11), 2515-2527. doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.077



- Gao, P. S., Mao, X. Q., Roberts, M. H., Arinobu, Y., Akaiwa, M., Enomoto, T., . . . Hopkin, J. M. (2000). Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet*, 37(5), 380-382.
- Gao, P. S., Rafaels, N. M., Mu, D., Hand, T., Murray, T., Boguniewicz, M., . . . Barnes, K. C. (2010). Genetic variants in thymic stromal lymphopoietin are associated with atopic dermatitis and eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol*, 125(6), 1403-1407 e1404. doi: 10.1016/j.jaci.2010.03.016
- Giltaire, S., Lambert, S., & Poumay, Y. (2011). HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways. *J Cell Physiol*, 226(6), 1651-1659. doi: 10.1002/jcp.22496
- Gittler, J. K., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2013). Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 131(2), 300-313. doi: 10.1016/j.jaci.2012.06.048
- Gniadecki, R., Christoffersen, N., & Wulf, H. C. (2002). Cholesterol-rich plasma membrane domains (lipid rafts) in keratinocytes: importance in the baseline and UVA-induced generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol*, 118(4), 582-588. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01716.x
- Gu, C., Wu, L., & Li, X. (2013). IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*, 64(2), 477-485. doi: 10.1016/j.cyto.2013.07.022
- Guttman-Yassky, E., Dhingra, N., & Leung, D. Y. (2013). New era of biologic therapeutics in atopic dermatitis. *Expert Opin Biol Ther*, 13(4), 549-561. doi: 10.1517/14712598.2013.758708
- Hallett, M. A., Venmar, K. T., & Fingleton, B. (2012). Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res*, 72(24), 6338-6343. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3544
- Hamid, Q., Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. (1994). Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 94(2), 870-876. doi: 10.1172/JCI117408
- Hanel, K. H., Cornelissen, C., Luscher, B., & Baron, J. M. (2013). Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci*, 14(4), 6720-6745. doi: 10.3390/ijms14046720
- Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Maruoka, S., & Horie, T. (2001). IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol*, 107(6), 1001-1008. doi: 10.1067/mai.2001.114702
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., & Duschl, A. (2006). Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(3), 173-188. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.01.004
- Heinzmann, A., Mao, X. Q., Akaiwa, M., Kreomer, R. T., Gao, P. S., Ohshima, K., . . . Deichmann, K. A. (2000). Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet*, 9(4), 549-559.
- Hershey, G. K. (2003). IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol*, 111(4), 677-690; quiz 691.
- Hu, N., Gibo, D. N., & Debinski, W. (2005). Cytokine up-regulation of IL13R- $\alpha$ 2 in GBM cells leads to an increased potency of recombinant IL13 cytotoxin. *Cancer Therapy*, 3, 531-542.
- Hvid, M., Vestergaard, C., Kemp, K., Christensen, G. B., Deleuran, B., & Deleuran, M. (2011). IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? *J Invest Dermatol*, 131(1), 150-157. doi: 10.1038/jid.2010.277

- Indra, A. K., & Leid, M. (2011). Epidermal permeability barrier measurement in mammalian skin. *Methods Mol Biol*, 763, 73-81. doi: 10.1007/978-1-61779-191-8\_4
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M., & Poumay, Y. (2004). Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol*, 123(3), 564-573. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23221.x
- Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., . . . Bouwstra, J. A. (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*, 53(12), 2755-2766. doi: 10.1194/jlr.P030338
- Jariwala, S. P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., & Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, 41(11), 1515-1520. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03797.x
- Jiang, H., Harris, M. B., & Rothman, P. (2000). IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol*, 105(6 Pt 1), 1063-1070.
- Junttila, I. S., Mizukami, K., Dickensheets, H., Meier-Schellersheim, M., Yamane, H., Donnelly, R. P., & Paul, W. E. (2008). Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, and  $\gamma$ c regulates relative cytokine sensitivity. *J Exp Med*, 205(11), 2595-2608. doi: 10.1084/jem.20080452
- Kabashima, K. (2013). New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J Dermatol Sci*, 70(1), 3-11. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.02.001
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., & Ley, S. C. (2000). Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 30(3), 954-963. doi: 10.1002/1521-4141(200003)30:3<954::AID-IMMU954>3.0.CO;2-Y
- Kaiser, H. W., Ness, W., Jungblut, I., Briggaman, R. A., Kreysel, H. W., & O'Keefe, E. J. (1993). Adherens junctions: demonstration in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 100(2), 180-185.
- Kamsteeg, M., Bergers, M., de Boer, R., Zeeuwen, P. L., Hato, S. V., Schalkwijk, J., & Tjabringa, G. S. (2011). Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. *Am J Pathol*, 178(5), 2091-2099. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.037
- Kamsteeg, M., Zeeuwen, P. L., de Jongh, G. J., Rodijk-Olthuis, D., Zeeuwen-Franssen, M. E., van Erp, P. E., & Schalkwijk, J. (2007). Increased expression of carbonic anhydrase II (CA II) in lesional skin of atopic dermatitis: regulation by Th2 cytokines. *J Invest Dermatol*, 127(7), 1786-1789. doi: 10.1038/sj.jid.5700752
- Kaplan, D. H., Igyarto, B. Z., & Gaspari, A. A. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*, 12(2), 114-124. doi: 10.1038/nri3150
- Kawakami, K., Kawakami, M., Leland, P., & Puri, R. K. (2002). Internalization property of interleukin-4 receptor alpha chain increases cytotoxic effect of interleukin-4 receptor-targeted cytotoxin in cancer cells. *Clin Cancer Res*, 8(1), 258-266.
- Kawakami, T., Ando, T., Kimura, M., Wilson, B. S., & Kawakami, Y. (2009). Mast cells in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*, 21(6), 666-678. doi: 10.1016/j.coi.2009.09.006
- Kelly-Welch, A. E., Hanson, E. M., Boothby, M. R., & Keegan, A. D. (2003). Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, 300(5625), 1527-1528. doi: 10.1126/science.1085458
- Kile, B. T., Schulman, B. A., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Martin, H. M., & Hilton, D. J. (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci*, 27(5), 235-241.

- Kim, B. E., Leung, D. Y., Boguniewicz, M., & Howell, M. D. (2008). Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*, 126(3), 332-337. doi: 10.1016/j.clim.2007.11.006
- Kim, S., Kim, Y., Lee, Y., Cho, K. H., Kim, K. H., & Chung, J. H. (2007). Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells. *FEBS Lett*, 581(20), 3869-3874. doi: 10.1016/j.febslet.2007.06.074
- Klymchenko, A. S., & Kreder, R. (2014). Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chem Biol*, 21(1), 97-113. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.11.009
- Kolls, J. K., & Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21(4), 467-476. doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.018
- Konstantinidis, A. K., Puddicombe, S. M., Mochizuki, A., Sheth, P. D., Yang, I. A., Yoshisue, H., . . . Holloway, J. W. (2008). Cellular localization of interleukin 13 receptor alpha2 in human primary bronchial epithelial cells and fibroblasts. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 18(3), 174-180.
- Kubo, A., Nagao, K., & Amagai, M. (2012). Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest*, 122(2), 440-447. doi: 10.1172/JCI57416
- Kurgonaite, K., Gandhi, H., Kurth, T., Pautot, S., Schwille, P., Weidemann, T., & Bokel, C. (2015). Essential role of endocytosis for interleukin-4-receptor-mediated JAK/STAT signalling. *J Cell Sci*, 128(20), 3781-3795. doi: 10.1242/jcs.170969
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., & Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*, 7(3), 661-671.
- Lambert, S., Ameels, H., Gniadecki, R., Herin, M., & Poumay, Y. (2008). Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation. *J Cell Physiol*, 217(3), 834-845. doi: 10.1002/jcp.21563
- Lambert, S., Vind-Kezunovic, D., Karvinen, S., & Gniadecki, R. (2006). Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol*, 126(5), 954-962. doi: 10.1038/sj.jid.5700168
- Landheer, J., Giovannone, B., Sadekova, S., Tjabringa, S., Hofstra, C., Dechering, K., . . . Knol, E. (2015). TSLP is differentially regulated by vitamin D3 and cytokines in human skin. *Immun Inflamm Dis*, 3(1), 32-43. doi: 10.1002/iid3.48
- LaPorte, S. L., Juo, Z. S., Vaclavikova, J., Colf, L. A., Qi, X., Heller, N. M., . . . Garcia, K. C. (2008). Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell*, 132(2), 259-272. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.030
- Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I., & Hamid, Q. A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 113(5), 651-657. doi: 10.1172/JCI21060
- Levin, J., Fallon Friedlander, S., & Del Rosso, J. Q. (2013). Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 3: the immune system in atopic dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol*, 6(12), 37-44.
- Leyva-Castillo, J. M., Hener, P., Jiang, H., & Li, M. (2013). TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. *J Invest Dermatol*, 133(1), 154-163. doi: 10.1038/jid.2012.239
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50. doi: 10.1126/science.1174621
- Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y., & Ossowski, L. (2002). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*, 1(5), 445-457.

- Liu, X., Beaty, T. H., Deindl, P., Huang, S. K., Lau, S., Sommerfeld, C., . . . Nickel, R. (2004). Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol*, 113(3), 489-495. doi: 10.1016/j.jaci.2003.12.037
- Liu, Y. J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, 203(2), 269-273. doi: 10.1084/jem.20051745
- Lopez, C. A., de Vries, A. H., & Marrink, S. J. (2013). Computational microscopy of cyclodextrin mediated cholesterol extraction from lipid model membranes. *Sci Rep*, 3, 2071. doi: 10.1038/srep02071
- Lu, Z. R., Park, D., Lee, K. A., Ryu, J. W., Bhak, J., Shi, L., . . . Yang, J. M. (2009). Profiling the dysregulated genes of keratinocytes in atopic dermatitis patients: cDNA microarray and interactomic analyses. *J Dermatol Sci*, 54(2), 126-129. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.12.006
- Maksimovic, S., Nakatani, M., Baba, Y., Nelson, A. M., Marshall, K. L., Wellnitz, S. A., . . . Lumpkin, E. A. (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*, 509(7502), 617-621. doi: 10.1038/nature13250
- Malaisse, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit, C., Nikkels, A. F., Flamion, B., & Poumay, Y. (2014). Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol*, 134(8), 2174-2182. doi: 10.1038/jid.2014.147
- Malajian, D., & Guttman-Yassky, E. (2015). New pathogenic and therapeutic paradigms in atopic dermatitis. *Cytokine*, 73(2), 311-318. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.023
- Marmor, M. D., & Julius, M. (2001). Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood*, 98(5), 1489-1497.
- Mascia, F., Mariani, V., Girolomoni, G., & Pastore, S. (2003). Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am J Pathol*, 163(1), 303-312. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63654-1
- Mathay, C., Giltaire, S., Minner, F., Bera, E., Herin, M., & Poumay, Y. (2008). Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*, 128(3), 717-727. doi: 10.1038/sj.jid.5701069
- Mathay, C., Pierre, M., Pittelkow, M. R., Depiereux, E., Nikkels, A. F., Colige, A., & Poumay, Y. (2011). Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *J Invest Dermatol*, 131(1), 46-58. doi: 10.1038/jid.2010.272
- MC Gillespie, R., & Brown, S. J. (2015). From the outside-in: Epidermal targeting as a paradigm for atopic disease therapy. *World Journal of Dermatology*, 4(1), 16-32. doi: 10.5314/wjd.v4.i1.16.
- McCormick, S. M., & Heller, N. M. (2015). Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*, 75(1), 38-50. doi: 10.1016/j.cyto.2015.05.023
- Merk, B. C., Owens, J. L., Lopes, M. B., Silva, C. M., & Hussaini, I. M. (2011). STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth. *BMC Cancer*, 11, 184. doi: 10.1186/1471-2407-11-184
- Mihm, M. C., Jr., Soter, N. A., Dvorak, H. F., & Austen, K. F. (1976). The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol*, 67(3), 305-312.
- Minner, F., Herphelin, F., & Poumay, Y. (2010). Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol*, 585, 71-82. doi: 10.1007/978-1-60761-380-0\_6
- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, A., & Ziegler, A. (1996). Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form

- a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*, 106(5), 989-992.
- Morar, N., Willis-Owen, S. A., Moffatt, M. F., & Cookson, W. O. (2006). The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1), 24-34; quiz 35-26. doi: 10.1016/j.jaci.2006.03.037
- Morrison, K. M., Miesegaes, G. R., Lumpkin, E. A., & Maricich, S. M. (2009). Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol*, 336(1), 76-83. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.032
- Mueller, S. N., Zaid, A., & Carbone, F. R. (2014). Tissue-resident T cells: dynamic players in skin immunity. *Front Immunol*, 5, 332. doi: 10.3389/fimmu.2014.00332
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(10), 679-691. doi: 10.1038/nri2622
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127(11), 2525-2532. doi: 10.1038/sj.jid.5700865
- Nomura, I., Goleva, E., Howell, M. D., Hamid, Q. A., Ong, P. Y., Hall, C. F., . . . Leung, D. Y. (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*, 171(6), 3262-3269.
- Novak, N., Bieber, T., & Leung, D. Y. (2003). Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 112(6 Suppl), S128-139. doi: 10.1016/j.jaci.2003.09.032
- Oh, M. H., Oh, S. Y., Yu, J., Myers, A. C., Leonard, W. J., Liu, Y. J., . . . Zheng, T. (2011). IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol*, 186(12), 7232-7242. doi: 10.4049/jimmunol.1100504
- Ohtani, T., Memezawa, A., Okuyama, R., Sayo, T., Sugiyama, Y., Inoue, S., & Aiba, S. (2009). Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol*, 129(6), 1412-1420. doi: 10.1038/jid.2008.394
- Oiso, N., Fukai, K., & Ishii, M. (2000). Interleukin 4 receptor alpha chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol*, 142(5), 1003-1006.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J. F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, 160(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x
- Omori-Miyake, M., Yamashita, M., Tsunemi, Y., Kawashima, M., & Yagi, J. (2014). In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans. *J Invest Dermatol*, 134(5), 1342-1350. doi: 10.1038/jid.2013.503
- Oyoshi, M. K., Larson, R. P., Ziegler, S. F., & Geha, R. S. (2010). Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J Allergy Clin Immunol*, 126(5), 976-984, 984 e971-975. doi: 10.1016/j.jaci.2010.08.041
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 14(5), 289-301. doi: 10.1038/nri3646
- Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V., & Girolomoni, G. (2008). The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J Invest Dermatol*, 128(6), 1365-1374. doi: 10.1038/sj.jid.5701184
- Pellerin, L., Henry, J., Hsu, C. Y., Balica, S., Jean-Decoster, C., Mechlin, M. C., . . . Simon, M. (2013). Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), 1094-1102. doi: 10.1016/j.jaci.2012.12.1566

- Peng, W., & Novak, N. (2015). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, 45(3), 566-574. doi: 10.1111/cea.12495
- Pesu, M., Aittomaki, S., Takaluoma, K., Lagerstedt, A., & Silvennoinen, O. (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription. *J Biol Chem*, 277(41), 38254-38261. doi: 10.1074/jbc.M201427200
- Pike, L. J. (2005). Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta*, 1746(3), 260-273. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.05.005
- Platta, H. W., & Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 23(4), 393-403. doi: 10.1016/j.ceb.2011.03.008
- Portilho, D. M., Soares, C. P., Morrot, A., Thiago, L. S., Butler-Browne, G., Savino, W., . . . Mermelstein, C. (2012). Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in myoblast cultures. *Eur J Pharmacol*, 694(1-3), 1-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.035
- Poumay, Y., & de Rouvroit, C. L. (2012). HB-EGF, the growth factor that accelerates keratinocyte migration, but slows proliferation. *J Invest Dermatol*, 132(9), 2129-2130. doi: 10.1038/jid.2012.225
- Prens, E., Hegmans, J., Lien, R. C., Debets, R., Troost, R., van Joost, T., & Benner, R. (1996). Increased expression of interleukin-4 receptors on psoriatic epidermal cells. *Am J Pathol*, 148(5), 1493-1502.
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17(12), 1063-1072.
- Purwar, R., Kraus, M., Werfel, T., & Wittmann, M. (2008). Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol*, 128(1), 59-66. doi: 10.1038/sj.jid.5700940
- Qu, C. K. (2000). The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell Res*, 10(4), 279-288. doi: 10.1038/sj.cr.7290055
- Rao, R., Logan, B., Forrest, K., Roszman, T. L., & Goebel, J. (2004). Lipid rafts in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(2-3), 103-110. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.01.003
- Rudikoff, D., Cohen, S. R., & Scheinfeld, N. (2014). *Atopic Dermatitis and Eczematous Disorders*. Boca Raton; London; New Yor: CRC press, Taylor & Francis Group.
- Salimi, M., & Ogg, G. (2014). Innate lymphoid cells and the skin. *BMC Dermatol*, 14, 18. doi: 10.1186/1471-5945-14-18
- Schindler, C., Levy, D. E., & Decker, T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 282(28), 20059-20063. doi: 10.1074/jbc.R700016200
- Segre, J. A. (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest*, 116(5), 1150-1158. doi: 10.1172/JCI28521
- Sehgal, P. B., Guo, G. G., Shah, M., Kumar, V., & Patel, K. (2002). Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J Biol Chem*, 277(14), 12067-12074. doi: 10.1074/jbc.M200018200
- Sehra, S., Yao, Y., Howell, M. D., Nguyen, E. T., Kansas, G. S., Leung, D. Y., . . . Kaplan, M. H. (2010). IL-4 regulates skin homeostasis and the predisposition toward allergic skin inflammation. *J Immunol*, 184(6), 3186-3190. doi: 10.4049/jimmunol.0901860
- Shirakawa, I., Deichmann, K. A., Izuhara, I., Mao, I., Adra, C. N., & Hopkin, J. M. (2000). Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today*, 21(2), 60-64.
- Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(10), a004697. doi: 10.1101/cshperspect.a004697

- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 31-39. doi: 10.1038/35036052
- Simpson, C. L., Patel, D. M., & Green, K. J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(9), 565-580. doi: 10.1038/nrm3175
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Sivaprasad, U., Warriar, M. R., Gibson, A. M., Chen, W., Tabata, Y., Bass, S. A., . . . Khurana Hershey, G. K. (2010). IL-13Ralpha2 has a protective role in a mouse model of cutaneous inflammation. *J Immunol*, 185(11), 6802-6808. doi: 10.4049/jimmunol.1002118
- Spergel, J. M., & Paller, A. S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*, 112(6 Suppl), S118-127. doi: 10.1016/j.jaci.2003.09.033
- Suarez-Farinas, M., Tintle, S. J., Shemer, A., Chiricozzi, A., Nograles, K., Cardinale, I., . . . Guttman-Yassky, E. (2011). Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol*, 127(4), 954-964 e951-954. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1124
- Tamarit, B., Bugault, F., Pillet, A. H., Lavergne, V., Bochet, P., Garin, N., . . . Rose, T. (2013). Membrane microdomains and cytoskeleton organization shape and regulate the IL-7 receptor signalosome in human CD4 T-cells. *J Biol Chem*, 288(12), 8691-8701. doi: 10.1074/jbc.M113.449918
- Tay, S. S., Roediger, B., Tong, P. L., Tikoo, S., & Weninger, W. (2014). The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep*, 3, 13-22. doi: 10.1007/s13671-013-0063-9
- Thomas, A., Depiereux, E., & Poumay, Y. (2012). Identification et analyse de gènes dont l'expression est régulée par la déplétion en cholestérol des kératinocytes épidermiques ainsi qu'au niveau de lésions de dermatite atopique *master thesis*.
- Trautmann, A., Altnauer, F., Akdis, M., Simon, H. U., Disch, R., Brocker, E. B., . . . Akdis, C. A. (2001). The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol*, 117(4), 927-934. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01474.x
- Tsuchisaka, A., Furumura, M., & Hashimoto, T. (2014). Cytokine regulation during epidermal differentiation and barrier formation. *J Invest Dermatol*, 134(5), 1194-1196. doi: 10.1038/jid.2014.15
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 112-124. doi: 10.1038/nrm2330
- Vladich, F. D., Brazille, S. M., Stern, D., Peck, M. L., Ghittoni, R., & Vercelli, D. (2005). IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest*, 115(3), 747-754. doi: 10.1172/JCI22818
- Voegeli, R., Rawlings, A. V., Breternitz, M., Doppler, S., Schreier, T., & Fluhr, J. W. (2009). Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *Br J Dermatol*, 161(1), 70-77. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09142.x
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, 13(4), 227-232. doi: 10.1038/nrg3185
- Wang, X. Q., & Paller, A. S. (2006). Lipid rafts: membrane triage centers. *J Invest Dermatol*, 126(5), 951-953. doi: 10.1038/sj.jid.5700282
- Wang, Y. H., Angkasekwinai, P., Lu, N., Voo, K. S., Arima, K., Hanabuchi, S., . . . Liu, Y. J. (2007). IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and

- functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*, 204(8), 1837-1847. doi: 10.1084/jem.20070406
- Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353(1370), 831-837. doi: 10.1098/rstb.1998.0247
- Weidinger, S., & Novak, N. (2015). Atopic dermatitis. *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00149-X
- Werfel, T. (2009). The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129(8), 1878-1891. doi: 10.1038/jid.2009.71
- Wery-Zennaro, S., Letourneur, M., David, M., Bertoglio, J., & Pierre, J. (1999). Binding of IL-4 to the IL-13Ralpha(1)/IL-4Ralpha receptor complex leads to STAT3 phosphorylation but not to its nuclear translocation. *FEBS Lett*, 464(1-2), 91-96.
- Wery, S., Letourneur, M., Bertoglio, J., & Pierre, J. (1996). Interleukin-4 induces activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of shc in human keratinocytes. *J Biol Chem*, 271(15), 8529-8532.
- Wills-Karp, M., & Finkelman, F. D. (2008). Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal*, 1(51), pe55. doi: 10.1126/scisignal.1.51.pe55
- Wongpiyabovorn, J., Suto, H., Ushio, H., Izuhara, K., Mitsuishi, K., Ikeda, S., . . . Ogawa, H. (2003). Up-regulation of interleukin-13 receptor alpha1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 33(1), 31-40.
- Zhang, J. G., Hilton, D. J., Willson, T. A., McFarlane, C., Roberts, B. A., Moritz, R. L., . . . Nicola, N. A. (1997). Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor alpha-chains. *J Biol Chem*, 272(14), 9474-9480.
- Zheng, T., Zhu, Z., Liu, W., Lee, C. G., Chen, Q., Homer, R. J., & Elias, J. A. (2003). Cytokine regulation of IL-13Ralpha2 and IL-13Ralpha1 in vivo and in vitro. *J Allergy Clin Immunol*, 111(4), 720-728.
- Ziegler, S. F., & Artis, D. (2010). Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol*, 11(4), 289-293. doi: 10.1038/ni.1852
- Ziyab, A. H., Davies, G. A., Ewart, S., Hopkin, J. M., Schauburger, E. M., Wills-Karp, M., . . . Karmaus, W. (2013). Interactive effect of STAT6 and IL13 gene polymorphisms on eczema status: results from a longitudinal and a cross-sectional study. *BMC Med Genet*, 14, 67. doi: 10.1186/1471-2350-14-67